



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STUDIUM TRANSPORTNÍCH PROCESŮ V
HYDROGELECH POMOCÍ MIKROREOLOGICKÝCH
TECHNIK**

STUDY OF TRANSPORT PROCESSES USING MICRORHEOLOGICAL TECHNIQUES IN HYDROGELS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Denisa Píšová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0986/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Denisa Píšová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Studium transportních procesů v hydrogelech pomocí mikroeologických technik

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši zaměřenou na využití mikroeologických technik ke studiu vlastností hydrogelů.
2. Na základě literární rešerše optimalizovat mikroeologické techniky (DLS, FCS) na vybraných hydrogelových systémech.
3. Využít optimalizované techniky ke studiu hydrogelových systémů na bázi polyelektrolytů.
4. Diskutovat a vzájemně korelovat naměřené výsledky.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Denisa Píšová
student(ka)

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cieľom tejto diplomovej práce bolo stanovenie viskoelastických vlastností agarózových hydrogélů s prídavkom polyelektrolýtov použitím mikrorheologických a makrorheologických techník. Z mikrorheologických techník bola vybraná metóda dynamického rozptylu svetla, pomocou ktorej bol sledovaný vplyv prídavku rôzneho objemu aktívnej látky, účinok rozlične nabitého polyelektrolýtu a taktiež vplyv iónovej sily na konečné mikrorheologické vlastnosti agarózových systémů. Pre zrovnanie výsledkov získaných použitím metódy mikrorheológie dynamického rozptylu svetla bola pre charakterizáciu agarózových hydrogélů s prídavkom polyelektrolýtov používaná i klasická reológia. Nakoniec boli makrorheologické a mikrorheologické výsledky vzájomne korelované.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the determination of viscoelastic properties of agarose hydrogels containing different polyelectrolytes by microrheological and macrorheological techniques. From microrheological techniques the dynamic light scattering was used. Firstly, the influence of different polyelectrolyte volume was studied. Then the effect of variously charged polyelectrolyte and ionic strength on microrheological properties of agarose hydrogels were determined. Classic rheology was used to compare the results obtained using the DLS microrheology method. Finally, the results from macro- and microrheology were correlated with each other.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

agaróza, hydrogély, polyelektolyty, mikrorheológia dynamického rozptylu svetla, mikrorheológia fluorescenčnej korelačnej spektroskopie, reológia

KEYWORDS

Agarose, hydrogels, polyelectrolyte, dynamic light scattering microrheology, microrheology with fluorescence correlation spectroscopy

PÍŠOVÁ, D. *Studium transportních procesů v hydrogelech pomocí mikrorheologických technik*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 70 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Jiří Smilek, Ph.D..

PREHLÁSENIE:

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som citovala správne a úplne. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Rada by som poďakovala svojmu vedúcemu diplomovej práce Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. a konzultantovi Ing. Michalovi Kalinovi, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady, pripomienky a čas, ktorý mi venovali. Ďalej by som chcela poďakovať svojej rodine za ich podporu.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Reológia	8
2.2	Viskoelasticita.....	9
2.3	Mikroreológia	10
2.3.1	Aktívna a pasívna mikroreológia	10
2.4	Mikroreológia dynamického rozptylu svetla	11
2.4.1	Výhody a nevýhody mikroreológie dynamického rozptylu svetla	15
2.5	Fluorescenčná spektrometria.....	16
2.5.1	Fluorescenčné sondy	18
2.6	Mikroreológia pomocou fluorescenčnej korelačnej spektrometrie.....	18
2.6.1	Výhody a nevýhody FCS mikroreológie.....	20
2.7	Gély.....	21
2.7.1	Vlastnosti gélov	22
2.8	Polyelektrolyty	24
2.8.1	Kyselina hyaluronová.....	25
2.8.2	Chitozán	26
2.8.3	Alginát.....	27
2.8.4	Dextrán	27
2.8.5	L-lysin	28
2.8.6	Polystyrén sulfonát.....	29
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY.....	30
4	Experimentálna časť	34
4.1	Používané chemikálie	34
4.2	Prístroje a zariadenia	34
4.3	DLS mikroreológia	35
4.3.1	Príprava roztokov pre meranie zeta potenciálu a veľkosti častíc.....	35
4.3.2	Príprava vzoriek pre optimalizáciu DLS mikroreológie	35
4.3.3	Nastavenie prístroja pre meranie DLS mikroreológie.....	36
4.4	Príprava agarózových hydrogélů s aktívnou látkou.....	36
4.4.1	Príprava zásobných roztokov polyelektrolytov	36
4.4.2	Príprava agarózového gélu s prídavkom polyelektrolytu.....	37
4.5	Príprava agarózových gélov pre sledovanie vplyvu iónovej sily.....	37
4.6	Reológia	38

4.6.1	Príprava vzoriek pre meranie reológie	38
4.6.2	Meranie reológie roztokov	38
5	MERANIE A VYHODNOTENIE DAT	40
5.1	Zeta potenciál a veľkosť častíc	40
5.2	Optimalizácia DLS mikoreológie	41
5.2.1	Objem mikoreologických častíc	41
5.2.2	Veľkosť mikoreologických častíc	42
5.2.3	Poloha merania	43
5.2.4	Sumarizácia optimalizácie DLS mikoreológie	43
5.2.5	Výber vhodnej koncentrácie agarózových gélov	44
5.3	Mikoreologická charakterizácia hydrogélův	46
5.3.1	Prídavok rôzneho objemu polyelektrolytu	46
5.3.2	Prídavok rozličného polyelektrolytu	49
5.3.3	Vplyv iónovej sily	52
5.4	Makoreologická charakterizácia hydrogélův	54
5.5	Korelácia dát	58
6	ZÁVER	60
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	62
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	69
8.1	Použité skratky	69
8.2	Použité symboly	70

1 ÚVOD

Charakteristika materiálov z hľadiska ich viskoelastických vlastností je dôležitá v mnohých priemyslových oblastiach. K štúdiu týchto vlastností sa využíva obor zvaný reológia, ktorý je na základe pohľadu na študovaný materiál možné rozdeliť do dvoch skupín. Jedná sa o makroreológiu a mikoreológiu. Použitím makroreológie je možné definovať mechanické vlastnosti materiálov z celkového pohľadu, pri čom mikoreologické techniky nám umožňujú skúmať lokálne zmeny v jeho mikroštruktúre. Použitím mikoreologických metód môžeme taktiež prekonať niektoré reologické obmedzenia, ako je napríklad rozsah frekvencie, počet parametrov, ktoré môžeme zistiť použitím tejto metódy alebo potrebný objem k štúdiu viskoelastických vlastností skúmaných materiálov. Použitím mikoreológie je možné zmerať i heterogénne materiály ako sú napríklad gély.

Mikoreologické techniky sa delia na aktívne metódy a pasívne metódy. Medzi pasívne metódy patria i techniky, ktoré sú založené na rozptyle svetla. Konkrétne sa jedná o mikoreológiu dynamického rozptylu svetla, kde na základe spontánneho pohybu vložených častíc dochádza k rozptylu svetelného lúča. U tejto metódy je možné pracovať v oveľa väčšom frekvenčnom rozsahu ako pri používaní iných pasívnych techník.

Gély sú disperzné koloidné systémy, v ktorých sú disperzné častice spojené do trojrozmernej siete, prestupujúcej celým disperzným prostredím. Svojím reologickým chovaním spadajú gély do skupiny viskoelastických materiálov. Vďaka ich dobrým mechanickým a transportným vlastnostiam sú využívané v mnohých odvetviach chémie.

K veľmi atraktívnym látkam tvoriacim gélové systémy patrí aj agaróza, ktorá sa radí medzi nenabité polysacharidy, vďaka čomu nevykazuje žiadne interakcie s okolím. Práve z tohto dôvodu sa agarózové hydrogély javia ako vhodná matrica pre sledovanie zmien viskoelastických vlastností po prídavku polyelektrolytu.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Reológia

Reológia je metóda, ktorá sa zaoberá štúdiom tokových vlastností a deformáciou skúmaného materiálu na základe pôsobiacej sily. Jej hlavnou úlohou je nájdenie vzťahov medzi napätím, deformáciou a rýchlosťou deformácie a teóriou elasticity [1].

Z mechanického hľadiska môžeme látky rozdeliť do troch základných skupenstiev: pevné, kvapalné a plynné. Neväzký plyn, nestlačiteľná väzká (newtonská) kvapalina a izotropné pružné teleso. Limitné chovanie väzkej nestlačiteľnej kvapaliny je dané ideálnou newtonskou kvapalinou, čo je kvapalina s nulovou viskozitou. Limitné chovanie pružného materiálu je tuhé teleso, majúce nekonečne veľký modul pružnosti [2].

V prípade ideálne viskózneho materiálu (newtonská kvapalina), platí pre tečné napätie klasický Newtonov zákon:

$$\tau = \eta \cdot \frac{du}{dx} = \eta \cdot D \quad (1)$$

kde η je dynamická viskozita charakterizujúca trenie newtonskej kvapaliny, du je vzájomná rýchlosť pohybu šmykových rovín vzdialených dx a D je takzvaný gradient rýchlosti, ktorý charakterizuje rýchlosť deformácie tekutiny. Dynamická viskozita je veličina, ktorej hodnota závisí na teplote a tlaku. Krivka popisujúca závislosť šmykového napätia na šmykovej rýchlosti sa nazýva toková krivka. Tvar tokovej krivky pre newtonské kvapaliny je lineárny, pri čom pri nulovej šmykovej rýchlosti je nulové aj napätie [2].

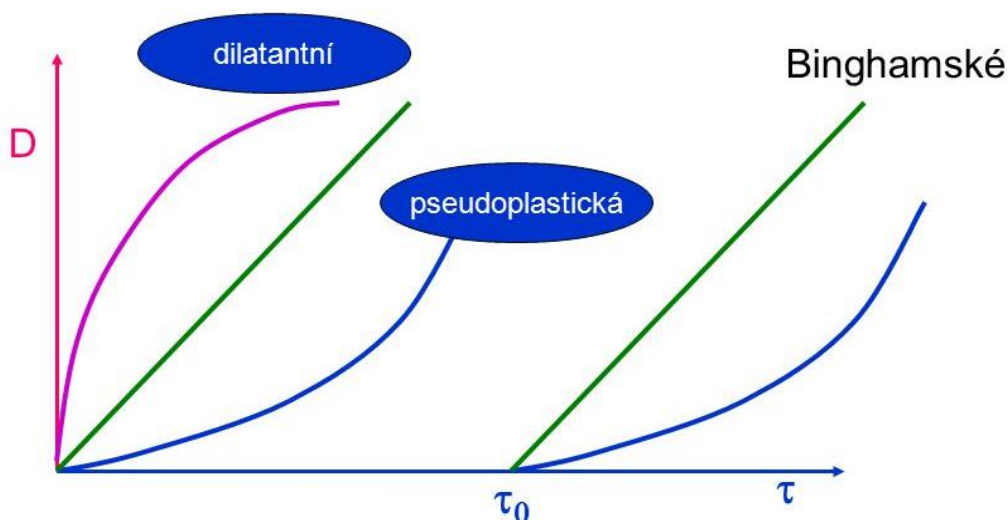
Za nenewtonské kvapaliny sú považované látky, ktorých hodnota viskozity nie je závislá na deformácii kvapaliny. Pre nenewtonské kvapaliny platí analogický Newtonov zákon:

$$\tau = \eta_{zd} \cdot D \quad (2)$$

kde η_{zd} je zdanlivá viskozita, ktorá nie je látkovou konštantou, je však závislá na rýchlosti deformácie alebo tečnom napätí.

Nenewtonské kvapaliny sa delia do troch skupín:

- Pseudoplastické látky, ktoré nevykazujú žiadnu medzu toku a ich zdanlivá viskozita sa znižuje so zvyšujúcou sa deformáciou látky. Patria sem napríklad koloidné roztoky alebo roztoky vysokomolekulárnych polymérov či mydiel.
- Diletantné kvapaliny majúce taktiež nulovú medzu toku. Ich zdanlivá viskozita sa zvyšuje s rastúcou deformáciou materiálu. Patria sem napríklad niektoré koncentrované suspenzie s veľkými časticami.
- Binghamské kvapaliny, teda látky s plastickou zložkou deformácie, ktorá závisí na hodnote šmykového napätia. Po prekročení tejto hodnoty začne kvapalina tiecť a vykazuje newtonské šmykové napätie. Medzi binghamské kvapaliny môžeme zaradiť suspenzie cementu či vápna, ale taktiež olejové farby alebo zubné pasty [3, 4].



Obrázok 1: Rozdelenie kvapalín podľa tokového chovania [5].

2.2 Viskoelasticita

Viskoelastické látky sú materiály, ktorých odozva na pôsobenie vonkajších síl je kombináciou elastických a viskózných prejavov. Reálne systémy, ako sú napríklad gély, majú komplikované viskoelastické vlastnosti [6].

Viskozita je veličina, charakterizujúca vnútorné trenie a závisí hlavne na príťažlivých silách medzi časticami. Látky s väčšou príťažlivou silou majú väčšiu viskozitu, čo znamená, že látka je pri svojom pohybe viac brzdená. V čisto viskóznom materiály je energia vždy disipovaná a materiál sa tak nevráti do svojho pôvodného tvaru [7].

Elasticita materiálu je definovaná ako miera náchylnosti pevnej látky k návratu do pôvodného tvaru po jej deformácii vonkajším tlakom. V čisto elastickom materiály je energia uchovávaná a po ukončení pôsobenia vonkajšieho napätia sa látka vráti do pôvodného stavu [6].

Pre sledovanie viskoelastických vlastností gélov, sa najčastejšie používajú oscilačné testy, teda test frekvenčný a amplitúdový. Pri amplitúdovom teste je nastavená rovnaká frekvencia oscilácie senzoru a mení sa amplitúda deformácie. Hodnota amplitúdy deformácie sa udáva v percentách. Hlavnou úlohou tohto testu je zistiť, pri akej amplitúde deformácie dochádza k nevratnému poškodeniu sledovanej vzorky, teda k nevratnému poškodeniu väzieb tvoriacich štruktúru gélu. Výstupom amplitúdového testu je závislosť viskoelastických modulov na amplitúde deformácie. Druhým spomínaným testom je test frekvenčný. Pri tomto teste senzor osciluje s definovanou frekvenciou, postupne od najväčšej hodnoty po najmenšiu, pri konštantnej amplitúde deformácie. Zaznamenávaná je závislosť viskoelastických modulov na frekvencii oscilácie [8].

Charakteristiku sledovanej látky potom môžeme získať stanovením stratového uhlu podľa nasledujúcej rovnice:

$$\operatorname{tg} \delta = \frac{G''}{G'} \quad (3)$$

kde G' je elastický modul a G'' značí modul viskózný. Pokiaľ je podiel modulov väčší ako 1, potom hovoríme o kvapalnej látke. Pokiaľ je však podiel modulov menší ako 1, jedná sa o látku tuhú [8].

Reologické vlastnosti možno teda merať z objemovej deformácie sledovanej vzorky, a to pomocou reometru. V prípade malého množstva vzorky, môžeme využiť alternatívnu a pomerne inovatívnu metódu zvanú mikrореológia, ktorá nám zároveň umožní náhľad do vnútornej štruktúry sledovaného materiálu.

2.3 Mikrореológia

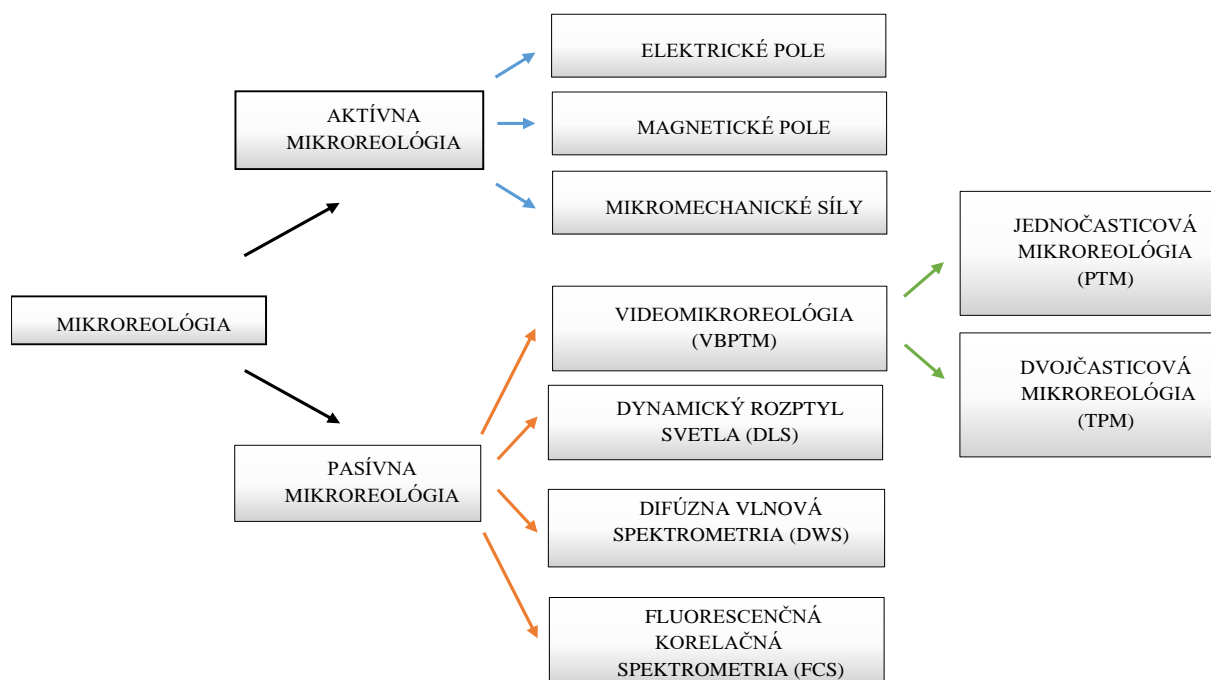
Mikrореológia je experimentálna technika charakterizujúca reologické vlastností komplexných tekutín, a to na základe sledovania pohybu malých vložených častíc pomocou vhodných metód, ako je napríklad dynamický rozptyl svetla, fluorescenčná korelačná spektrometria a iné. Od svojho uvedenia medzi techniky bola rozšírená v niekoľkých smeroch a počet žiadostí o rozvoj techniky neustále rastie, od molekulárnych tekutín, polymérov, DNA ku koloidom, kryštálom, biopolymérom alebo napríklad biologických buniek. Na rozdiel od obvyklých reologických meraní, pri ktorých sa umiestni makroskopická vzorka medzi pevné pohyblivé steny, ponúka mikrореológia množstvo výhod. Medzi významné výhody oproti klasickej reológii patrí to, že mikrореológia umožňuje merať viskoelasticitu v širokom frekvenčnom rozsahu. Ďalšou výhodou je možnosť použitia malého množstva materiálu, teda je možné merať bunky aj tkanivá a je možné zistiť, ako sú odozva materiálu a povrchové vlastnosti závislé od veľkosti použitých mikrореologických častíc. Použitím mikrореológie je možné zmerať i nehomogénne materiály. Mikrореológia sa na základe pohybu vložených sledovaných častíc rozdeľuje do dvoch hlavných techník: pasívna mikrореológia a aktívna mikrореológia [9, 10].

2.3.1 Aktívna a pasívna mikrореológia

Aktívne mikrореologické techniky zahŕňajú manipuláciu s vloženými časticami pomocou vonkajších síl, napríklad použitím magnetického poľa, elektrického poľa alebo mikromechanických síl. Tieto merania sú analogické s klasickou reológiou, v ktorej je vonkajšie napätie aplikované na vzorku a výsledné napätie sa meria k získaniu fundamentálnych reologických parametrov. V tomto prípade však vložené sondy o veľkosti mikrónov spôsobujú lokálne deformácie materiálu a skúmajú jeho viskoelastickú odozvu. Aktívne mikrореologické metódy sú vhodné na meranie vzoriek, obsahujúcich elastickú zložku materiálu [11].

Druhou triedou mikrореologických techník je pasívna mikrореológia, ktorá využíva iba Brownov pohyb začlenených častíc. Tento druh mikrореológie možno použiť len pre tekuté alebo polotuhé materiály, v ktorých je možné detekovať tepelný pohyb vložených mikrореologických častíc. Pasívna mikrореológia sa ďalej rozdeľuje na videomikrореológiu (*video based particle tracking microrheology* – VBPTM), ktorá sa podľa počtu sledovaných častíc delí na jednočasticovú mikrореológiu (*particle tracking microrheology* – PTM) a dvojčasticovú mikrореológiu (*two particle tracking microrheology* – TPM). Ďalej do pasívnych techník patria metódy ako dynamický rozptyl svetla (*dynamic light scattering* – DLS), difúzna vlnová spektrometria (*diffusing wave spectroscopy* – DWS)

či fluorescenčná korelačná spektrometria (*fluorescence correlation spectroscopy* – FCS) [12, 13].



Obrázok 2: Hierarchické usporiadanie mikoreologických metód [12].

Keďže bude v tejto diplomovej práci využívaná k charakterizácii gélových systémov metóda dynamického rozptylu svetla, bude nasledujúca kapitola venovaná práve tejto pasívnej mikoreologickej technike.

2.4 Mikoreológia dynamického rozptylu svetla

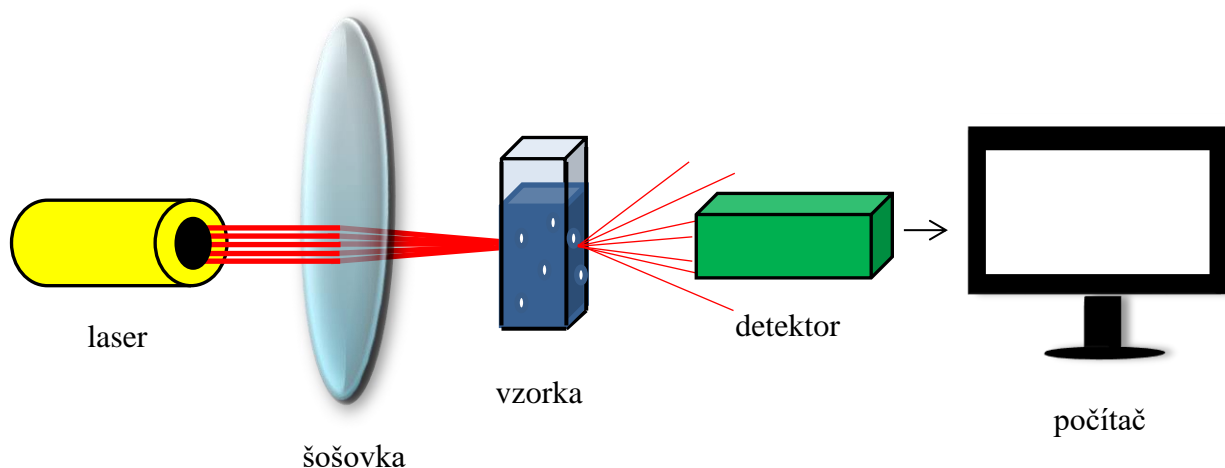
Mikoreológia dynamického rozptylu svetla (DLS), tiež známa ako kvázi elastický rozptyl svetla (QELS) alebo fotónová korelačná spektroskopia (PCS), spadá do oblasti pasívnej mikoreológie, čo znamená, že technika je založená na sledovaní Brownova tepelného pohybu vložených častíc. Rozptylové techniky v oblasti mikoreológie využívajú laser dopadajúci na vzorku, v ktorej sa nachádza množstvo pohybujúcich sa mikoreologických častíc. Dopadajúci svetelný lúč z laseru je týmito časticami homogénne rozptýlený a zachytený detekčnou optikou pre meranie intenzity rozptýleného svetla (Obrázok 3). Ideálne je, pokiaľ je každý fotón rozptýlený iba raz a ihneď je nasmerovaný k detektoru. Viacnásobný rozptyl svetla je nežiadúci jav [14, 15].

Meranie mikoreológie dynamického rozptylu svetla pozostáva z troch krokov:

- Zeta-potenciál – je nutné zistiť, či vkladané častice neinteragujú medzi sebou alebo so skúmaným materiálom. Pokiaľ je nameraná hodnota zeta-potenciálu sledovaného roztoku vyššia ako $|30 \text{ mV}|$, vtedy majú molekuly študovaného materiálu a mikoreologické častice dostatočne veľký náboj na to, aby sa odpudzovali, a tak nedochádza k ich agregácii. Hodnota zeta-potenciálu nám teda udáva stabilitu meraného roztoku.

- Veľkosť častíc – je potreba sa uistiť, že k rozptylu svetla dochádza na nami vložených časticiach a nie na molekulách skúmaného materiálu. Do sledovaného roztoku sa vkladajú mikrereologické častice o známom rozmere. Po zmeraní veľkosti častíc tohto roztoku, by sme mali dostať rovnakú hodnotu nameranej veľkosti, akú mali naše vkladané mikrereologické častice. Pokiaľ sa nameraná hodnota veľkosti častíc zhoduje s rozmerom použitých mikrereologických častíc, znamená to, že k rozptylu svetla dochádza na mikrereologických časticiach a nie na sledovanom materiály, respektíve na disperznom prostredí.
- Mikrereológia [16].

Meranie DLS môže byť vykonané na vzorkách s komplexnou viskozitou v rozmedzí od jednotiek mPa·s (napríklad voda) do niekoľko tisíc mPa·s (ako má napríklad gél). Výsledkom použitia tejto metódy je priemerná hodnota stredného kvadratického posunu (MSD – *mean square displacement*) všetkých častíc ako funkcia času a hodnoty modulov ako funkcia frekvencie [17].



Obrázok 3: Schematické znázornenie princípu DLS mikrereológie [15].

Trajektórie častíc, ktoré sú sledované voľne v objeme alebo na povrchu vzorku, dovoľujú vypočítať stredný kvadratický posun častíc ($\text{MSD} = \langle \Delta r^2(\tau) \rangle$), ktorý súvisí s difúznym koeficientom D podľa nasledujúcej rovnice:

$$\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = 2 \cdot d \cdot D \cdot \tau \cdot \alpha \quad (4)$$

kde zátvorky označujú priemernú hodnotu stredného kvadratického posunu všetkých častíc v čase, d je d -rozmer častíc, v ktorých pohyb prebieha. Častice sledované pomocou DLS mikrereológie môžu vykonávať pohyb v troch osách, teda v osách x , y a z . Práve preto je pri použití tejto metódy hodnota $d = 3$. D je difúzny koeficient, τ je časový interval a α je časový exponent [18].

Tepelne riadený pohyb je veľmi odlišný v čisto viskóznom médiu a vo viskoelastickom médiu. Vo viskóznom systéme je časový exponent $\alpha = 1$. Vďaka tomu môžeme pozorovať lineárny prírastok MSD s časom, pre voľne sa pohybujúce častice, v dôsledku tepelných

fluktuácii v newtonskej kvapaline (Obrázok 4). Sklon tohto prírastku je reprezentovaný difúznym koeficientom častice, ktorý získame použitím Einsteinovho vzťahu:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{f} \quad (5)$$

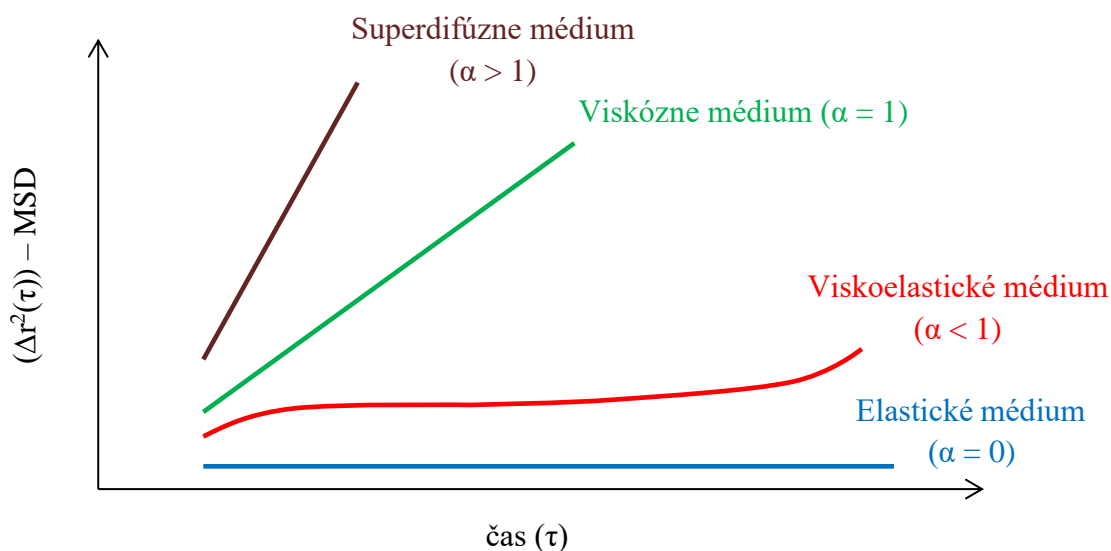
kde k_B je Boltzmanová konštanta, T je teplota a f je frikčný koeficient, ktorý je pre guľovité častice daný Stokesovým zákonom: $f = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r$. Po doplnení do Einsteinovej rovnice získame Stokes – Einsteinov vzťah:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad (6)$$

kde r je polomer častice a η je dynamická viskozita. Spojením rovníc 4, 6 a následnou úpravou, získame vzťah pre výpočet viskozity materiálu:

$$\eta = \frac{2 \cdot d \cdot k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r} \cdot \frac{\tau \cdot \alpha}{\langle \Delta r^2(\tau) \rangle} \quad (7)$$

Pokiaľ máme viskózne médium, potom je $\tau / \langle \Delta r^2(\tau) \rangle$ konštantné, nezávislé na časovom intervale, čo znamená, že MSD sa lineárne zvyšuje s časom oneskorenia. Čím viac je materiál viskóznejší, tým je smernica nárastu pomalšia. Preto môžeme povedať, že čím viskóznejšie médium máme, tým dostávame nižší nárast smernice a teda i nižší difúzny koeficient [14, 19].

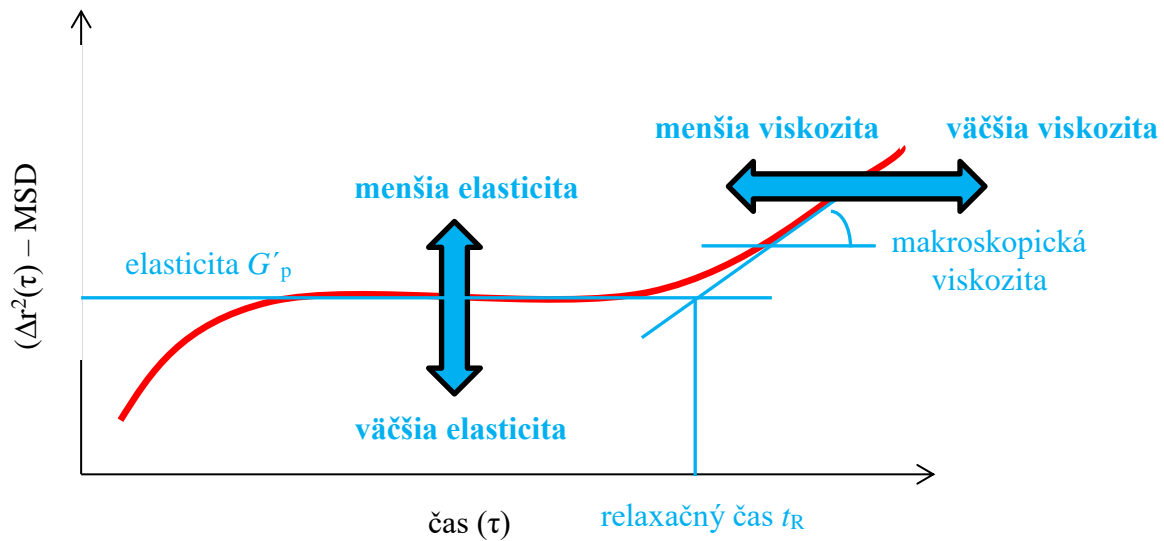


Obrázok 4: Závislosť MSD na časovom intervale pre rôzne prostredia [12].

Pokiaľ je časový exponent $\alpha = 0$, funkcia MSD vytvára priamku rovnobežnú s osou x . Tento tvar smernice je zapríčinený tým, že vložené mikrореologické častice sú zakliesnené v elastickom médiu, a preto sa v ňom nemôžu spontánne pohybovať. Ďalej rozlišujeme chovanie superdifúzne. Vtedy je časový exponent $\alpha > 1$. Toto chovanie je typické pre častice,

ktorých pohyb je ovplyvňovaný pôsobením vonkajších síl. Vtedy získaná smernica pohybu častíc v čase vykazuje opäť lineárny nárast, ktorý je však v porovnaní so smernicou pre viskózne médium vyšší.

Pohyb vložených častíc v nenewtonskej kvapaline je spojený s reologickými vlastnosťami okolitej tekutiny. V dôsledku prirodzených mikroštruktúrnych prvkov, prítomných v týchto materiáloch, má väčšina z nich schopnosť ukladať a čiastočne rozptyľovať energiu pri posune častíc, čím získava tento materiál viskoelastické vlastnosti. MSD krivka už nie je lineárna, ale nadobúda subdifúzivný charakter z dôvodu pribúdania elastickej zložky materiálu (Obrázok 5). Časový exponent je v tomto prípade $\alpha < 1$. Každá MSD krivka je však akýmsi „otlačkom prstu“ každého študovaného materiálu [17].



Obrázok 5: MSD krivka pre viskoelastické materiály [20].

Na základe obrázku 5 môžeme tvrdiť, že čím vzdialenejšia je lineárna časť získanej MSD priamky od osy x , tým má skúmaný materiál väčšiu viskozitu, vykazuje teda menšiu elasticitu. Sklon posledného nárastu MSD priamky nám určuje makroskopickú viskozitu. Čím nižší je tento sklon, tým väčšia je makroskopická viskozita. Hodnotu relaxačného času môžeme určiť graficky, podľa ukážky na obrázku 5 [20].

V DLS experimentoch sú hodnoty $MSD(\tau)$ získané pomocou autokorelačnej funkcie $g_1(\tau)$:

$$g_1(\tau) = g_1(0) \cdot e^{\frac{q^2}{6} \langle \Delta r^2(\tau) \rangle} \quad (8)$$

kde $g_1(0)$ je hodnota korelácie v čase nula a q je veľkosť rozptylu, ktorý je daný ako:

$$q = \frac{4 \cdot \pi \cdot n}{\lambda} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (9)$$

kde n je index lomu rozpúšťadla, λ je vlnová dĺžka svetla a θ je uhol rozptylu. Korelačný čas τ je spojený s časom t podľa rovnice: $\tau = 2 \cdot \pi / t$, potom $\omega = 1 / \tau$ [17].

MSD častíc sa vzťahuje ku korelačnej funkcii nasledovne [16]:

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = \frac{1}{q^2} \cdot [\log(g_1(0)) - \log(g_1(\tau))] \quad (10)$$

Pre platnosť rovnice 9 je dôležité aby bol experiment vykonaný v jednorozptylovom režime. Komplexný modul pružnosti v šmyku $G^*(s)$ môže byť získaný na základe Laplaceovej transformácie MSD použitím zovšeobecnenej Stokes – Einsteinovej rovnice:

$$G^*(s) = \frac{k_B \cdot T}{\pi \cdot r \cdot s \cdot \langle \Delta r^2(s) \rangle} \quad (11)$$

Táto rovnica môže byť prepracovaná pomocou Fourierovej transformácie a logaritmické gradienty krivky MSD môžu byť použité na výpočet elastického G' a viskózneho G'' modulu, vďaka tomu, že logaritmický spád (α) MSD môžeme považovať za analogický k fázovú uhlu v mechanickom reometre.

$$\begin{aligned} G'(\omega) &= G^*(\omega) \cdot \cos[\pi \cdot \alpha(\omega) / 2] \\ G''(\omega) &= G^*(\omega) \cdot \sin[\pi \cdot \alpha(\omega) / 2] \end{aligned} \quad (12)$$

Komplexnú viskozitu potom môžeme vypočítať použitím nasledujúcej rovnice [14, 16, 17]:

$$\eta^*(\omega) = \sqrt{\frac{[G''(\omega)]^2 + [G'(\omega)]^2}{\omega^2}} \quad (13)$$

2.4.1 Výhody a nevýhody mikrореолógie dynamického rozptylu svetla

Výhody DLS mikrореолógie:

- Veľkou výhodou tejto techniky je malé množstvo vzorku, ktoré je potrebné pre uskutočnenie jeho analýzy. Potrebný objem sa pohybuje v rádoch mikrolitra, čo umožňuje charakterizovať i tie vzorky, ktoré sú dostupné iba v obmedzenom množstve, ako sú napríklad drahé proteínové roztoky.
- Dosahuje vyšších frekvencií ako klasická reológia. DLS mikrореолógia využívajúca laser dokáže oproti klasickej reológii skúmať širší frekvenčný rozsah. Vďaka tomu je dynamické chovanie roztoku zachytené v krátkom čase.
- Meranie DLS mikrореолógie prebieha rýchlo, pretože získanie dát zo sledovaného Brownovho pohybu častice, prebieha v kompletnom rozsahu frekvencií a to naraz. Tým sa zisk nameraných dát urýchlí.
- Pokiaľ využijeme mikrореологickú techniku s jediným detekčným rozptylom, môžeme sledovať i roztoky, obsahujúce nižšie koncentrácie vkladáných, pozorovaných častíc.
- Meranie prebieha pri veľmi nízkom napätí. Z Brownova pohybu pozorovanej častice sa určuje lineárna dynamika meraného vzorku. DLS mikrореолógia je veľmi vhodná pre systémy, ktoré sú veľmi citlivé na tlak [21].

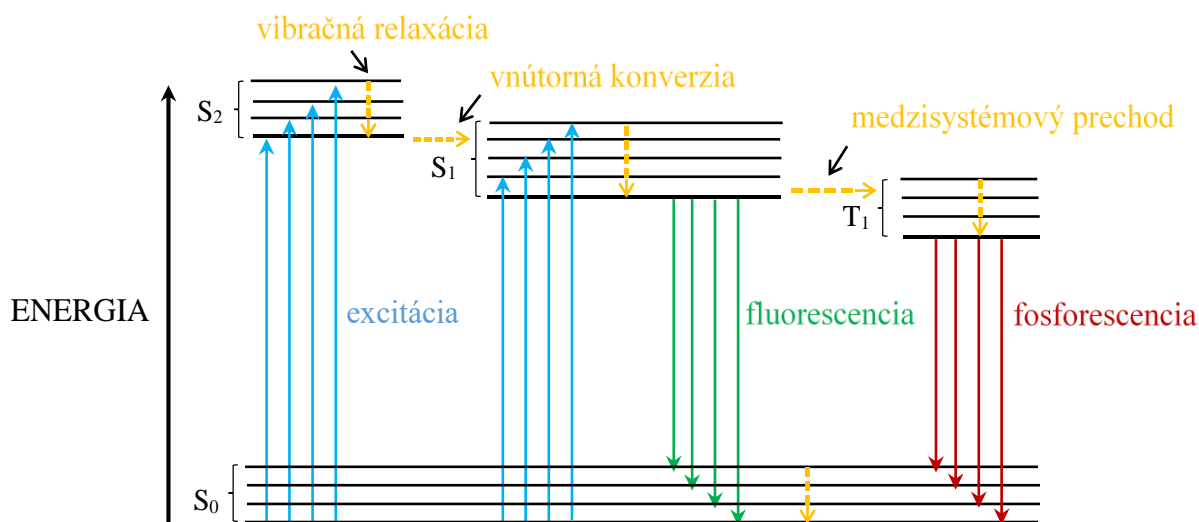
Nevýhody DLS mikrореолógie:

- DLS mikrореолógia nie je schopná presne lokalizovať nami pridanú časticu, takže môže dôjsť k jej zámene s nejakou prítomnou nečistotou, ktorá môže byť napríklad i prachovou časticou. Preto ak začleníme MSD prachovej častice k MSD sledovaných častíc môže dôjsť ku skresleniu výsledku.
- Pri DLS môže dochádzať do určitej miery i k viacnásobnému rozptylu svetla, čo je pre merania nežiadúcim javom [18].

Ďalšou technikou z oblasti pasívnej mikrореолógie, ktorá by mala byť používaná v tejto diplomovej práci je mikrореолógia fluorescenčnej korelačnej spektrometrie. Práve preto budú nasledujúce kapitoly venované práve tejto mikrореологической technike.

2.5 Fluorescenčná spektrometria

Luminescencia je emisia žiarenia z akejkoľvek látky, ktorá nastane vďaka excitácií elektrónového stavu molekuly. Pri absorpcii žiarenia o určitej vlnovej dĺžke (excitácii molekuly) prechádzajú elektróny zo základného stavu S_0 do jednej z mnohých vibračných hladín excitovaného stavu (S_1 , S_2 až S_n). Absorbovaná energia pritom odpovedá energetickému rozdielu základného a výsledného stavu molekuly. Nasleduje uvoľnenie prebytočnej energie excitovaných elektrónov, čo znamená, že excitované elektróny relaxujú do nižších vibračných hladín excitovaného stavu a v niektorých prípadoch až do základného stavu molekuly (Obrázok 6) [22].



Obrázok 6: Jablonského diagram znázorňujúci rôzne druhy deaktivácie excitovanej molekuly [23].

Spomínaná energia elektrónu môže byť uvoľnená nasledujúcimi procesmi:

- Vnútorná konverzia – nastáva, pokiaľ sa energetické podhladiný excitovaného stavu S_1 prekrývajú s vibračnými podhladinami základného stavu, teda stavu S_0 . Elektrón tak môže prechádzať medzi hladinami bez toho, aby uvoľňoval energiu žiarením.

- Vibračná relaxácia – excitovaný elektrón prechádza z jednej vibračnej podhladinu excitovaného stavu na najnižšiu vibračnú podhladinu stavu S_1 . Keďže je medzi jednotlivými podhladinami malý energetický rozdiel, svetlo, ktoré sa uvoľní pri relaxácii elektrónu bude vo forme infračerveného žiarenia. Pokiaľ sa spojí vnútorná konverzia s následnou vibračnou relaxáciou, môže sa elektrón z excitovaného stavu S_1 dostať až na základnú hladinu S_0 a to nežiarivým prechodom.
- Medzisystémový prechod – nastáva, pokiaľ u elektrónu nastane zmena jeho spinu. Elektrón vtedy prechádza zo singletového stavu S_1 do stavu tripletového T_1 , ktorý má nižšiu energiu. Keďže je tento prechod izoenergetický, k uvoľneniu energie dochádza až pri následnej relaxácii elektrónu [23].
- Fosforescencia – jedná sa o relaxáciu excitovaného elektrónu z tripletového stavu, v ktorom má elektrón rovnakú spinovú orientáciu ako v jeho základnom stave, do singletového stavu. Pri tomto prechode dochádza k emisii žiarenia. Pretože je elektrónový prechod $S_0 \rightarrow T_1$ zakázaný, najskôr je elektrón excitovaný na hladinu S_1 a potom je uskutočnený medzisystémový prechod na hladinu T_1 . Z tohto dôvodu má tripletový stav dlhú životnosť a rýchlosť fosforescencie je pomalá (10^{-3} – 10^0 sekúnd). Fosforescencia je zlé pozorovaná vo vysoko viskózných roztokoch pri laboratórnej teplote, a to kvôli veľkému množstvu konkurenčných procesov ako sú nežiarivé prechody a zhasávanie [22, 25].
- Fluorescencia – je dej, pri ktorom prechádza excitovaný elektrón zo singletového stavu S_1 do základného stavu S_0 za uvoľnenia nadbytočnej energie, vo forme žiarenia. Fluorescencia má krátku dobu života, približne 10^{-8} sekúnd. Vlnová dĺžka a tým i energia vyžarovaného svetla je závislá na rozdieli energie medzi základným a singletovým excitovaným stavom. Celkovú energetickú bilanciu fluorescenčných procesov môžeme zapísať v nasledujúcom tvare:

$$E_{fluor} = E_{abs} - E_{vib} - E_{solv.relax.} \quad (16)$$

kde E_{fluor} je energia emitovaného svetla, E_{abs} je energia absorbovaného svetla molekulou pri jej excitácii a E_{vib} je energia spotrebovaná pri vibračných prechodoch elektrónu. $E_{solv.relax.}$ je energia, ktorú molekula potrebuje na svoju preorientáciu v excitovanom a potom v základnom stave. Z uvedenej rovnice vyplýva, že fluorescenčná energia je vždy menšia ako energia absorbovaná. Práve preto má pozorované emitované svetlo vždy vyššiu vlnovú dĺžku, ako svetlo, potrebné pri excitácii molekuly [22].

Z dôvodu krátkej doby fluorescencie, vyžaduje meranie časovo rozlíšených emisií sofistikovanú optiku a elektroniku. Navzdory zvýšenej zložitosti, časovo rozlíšená fluorescencia je široko používaná, pretože z jej dát môžeme získať množstvo potrebných informácií a dokonca viac, ako by sme získali meraním molekuly v klude alebo v jej ustálenom stave. Pokroky v technológií umožnili sledovať časovo rozlíšené merania použitím mikroskopu [25].

Fluorescenciu obvykle vykazujú niektoré aromatické molekuly, nazývané fluorofory. Výstupom fluorescenčného merania je emisné spektrum, závislosť intenzity fluorescencie na vlnovej dĺžke, ktoré je jedinečné pre každý fluorofor [23].

2.5.1 Fluorescenčné sondy

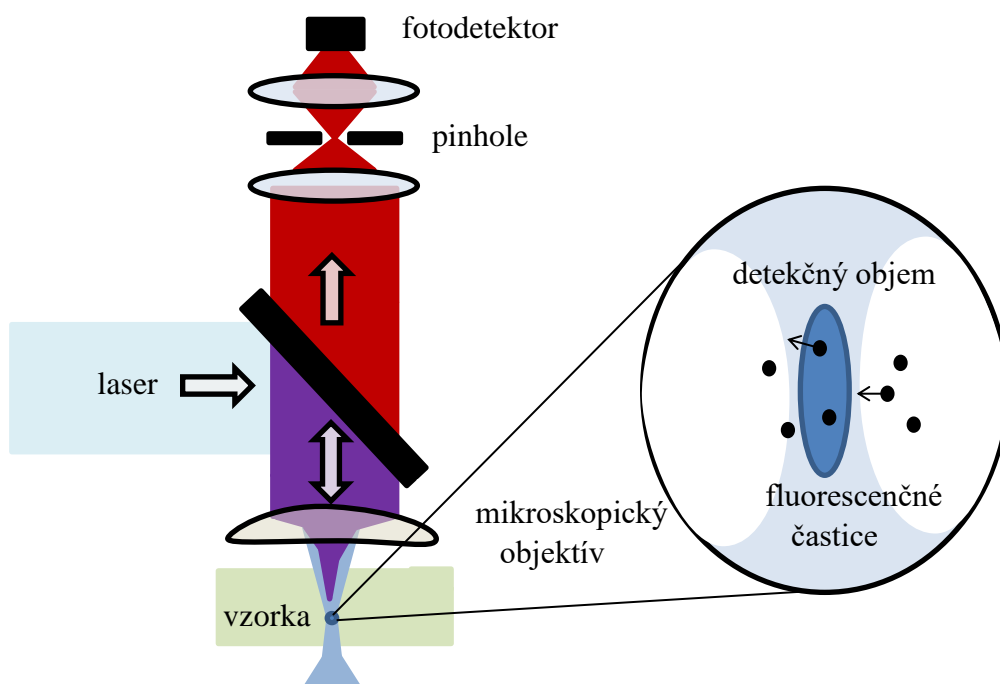
Fluorescenciu poskytujú niektoré aromatické molekuly – fluorofory, čo sú organické planárne látky, obsahujúce množstvo konjugovaných väzieb. Fluorofory sú rozdelené do dvoch hlavných skupín: vnútorné (vlastné) – vyskytujúce sa prirodzene, napríklad flavín a chlorofyl a vonkajšie (nevlastné) – pridávajú sa k sledovanej vzorke, ktorá nemá vhodné fluorescenčné vlastnosti. Medzi vonkajšie fluorofory patria napríklad látky: chinin, fluorescein alebo rhodamin [26].

Fluorescenčné sondy predstavujú najdôležitejšiu oblasť fluorescenčnej spektrometrie, pretože určujú vlnovú dĺžku a požadované časové rozlíšenie prístroja. Vlastnosťami zvolenej fluorescenčnej sondy sú určené i namerané dáta. Fluorescenčné látky sú citlivé na zmenu prostredia a zároveň majú špecifický tvar, vďaka ktorému sa viažu na konkrétne miesto v skúmanom materiáli. Dôležitou vlastnosťou fluoroforu je taktiež jeho doba života, takže doba, po ktorú fluorofor v excitovanom stave interaguje s prostredím molekuly a emisia svetla o určitej vlnovej dĺžke [17].

2.6 Mikrereológia pomocou fluorescenčnej korelačnej spektrometrie

Fluorescenčná korelačná spektrometria (FCS) je špeciálne odvetvie fluorescenčnej spektrometrie, ktorej predmetom záujmu je sledovanie fluktuácie intenzity fluorescencie vo veľmi malých objemoch, o veľkosti niekoľkých femtolitrov. Kolísanie intenzity fluorescencie je spôsobené difúziou fluorescenčných častíc cez konfokálny objem, čo je objem vytvorený zafokusovaním laserového lúča. Pokiaľ sa vložená fluorescenčná častica nachádza v pozorovanom objeme dôjde k zvýšeniu intenzity jej fluorescencie, pokiaľ častica tento objem opustí, jej fluorescencia sa zníži. Fluktuácia fluorescencie môže taktiež nastať v prípade, že excitovaný elektrón prechádza medzisystémovým prechodom z prvého singletového stavu S_1 do stavu tripletového T_1 . Použitím metódy FCS môžeme stanoviť difúzny koeficient samodifúzie či koncentráciu používaných častíc, ale taktiež viskoelastické vlastnosti okolitého prostredia, teda prostredia, v ktorom sa fluorescenčné častice nachádzajú. Aplikáciou FCS mikrereológie je možné okrem difúzneho koeficientu samodifúzie určiť aj relaxačný čas a hodnoty MSD pohybujúcich sa častíc v čase [29, 30, 31].

FCS mikrereológia využíva konfokálny mikroskop pre detekciu fluorescenčne značených molekúl, pohybujúcich sa v detekčnom objeme. Koncentrácia pridávaného fluoroforu do skúmanej vzorky je veľmi malá, približne $1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ častíc, pretože v detekčnom objeme je potrebných len niekoľko molekúl. Vkladané molekuly sa pohybujú Brownovým pohybom, na základe čoho sa táto metóda radí k pasívnym mikrereologickým technikám. K eliminácii nežiadúcich signálov prichádzajúcich mimo detekčný objem sa používa pinhole, konfokálna štrbina. Fluorescenčné žiarenie emitované molekulami následne dopadá na fotodetektor, napríklad fotodiodu alebo fotonásobič (Obrázok 7) [25, 32].



Obrázok 7: Schematické znázornenie fluorescenčnej korelačnej spektrometrie [33].

Dáta, ktoré dostaneme použitím metódy FCS musia byť podrobené niekoľkým krokom spracovania. V prvom kroku musí byť stanovená intenzita fluktuácie častíc $I(t)$, pomocou ktorej môžeme stanoviť autokorelačnú krivku podľa nasledujúcej rovnice:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \cdot \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (14)$$

$$I(t) = \langle I \rangle_t + \delta I(t) \quad (15)$$

kde $I(t)$ je intenzita fluorescencie v čase t a $I(t + \tau)$ je intenzita fluorescencie v čase $(t + \tau)$. Hodnota autokorelačnej funkcie $G(\tau)$ v čase nula, umožňuje získať informáciu o fluktuácii fluorescenčného signálu:

$$G(0) = \frac{1}{N} = \frac{1}{V \cdot c} \quad (16)$$

kde N je počet pozorovaných molekúl, V je detekčný objem a c je koncentrácia fluorescenčných častíc v roztoku [32].

Aby sme mohli stanoviť veličinu, ktorá je naším predmetom záujmu, musí dôjsť k prispôbeniu autokorelačnej krivky pomocou modelovej funkcie. Konkrétny výraz autokorelačnej funkcie použitej pre analýzu dát závisí na tvare detekčného objemu,

takže na optickom usporiadaní a použitých fluorescenčných častíc. Za dobrú aproximáciu je považovaný trojrozmerný Gaussian profil:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \cdot \tau_D}\right)^{-\frac{1}{2}} \quad (17)$$

kde $N = V \cdot c$ je priemerný počet molekúl v detekčnom objeme $V = \pi^{3/2} \cdot w_0 \cdot S$, kde S je pomer strán detekčného objemu a w_0 je jeho veľkosť ($1/e^2$ radius). Čas difúzie

$$\tau_D = \frac{w_0^2}{4 \cdot D} \quad (18)$$

môže byť použitý pre výpočet súčiniteľa difúzie D . Aby sme však mohli stanoviť difúzny koeficient, je nevyhnutné poznať parametre popisujúce geometriu detekčného objemu, to je w_0 a S . Tieto parametre sú stanovené na základe merania kalibračného farbiva so známym difúznym koeficientom. Na základe Stokes – Einsteinovej rovnice (Rovnica 6) môžeme tvrdiť, že difúzny koeficient závisí na hydrodynamickom polomere difundujúcej častice a na mikroviskozite okolitého prostredia [32].

2.6.1 Výhody a nevýhody FCS mikrореолógie

Výhody FCS mikrореолógie:

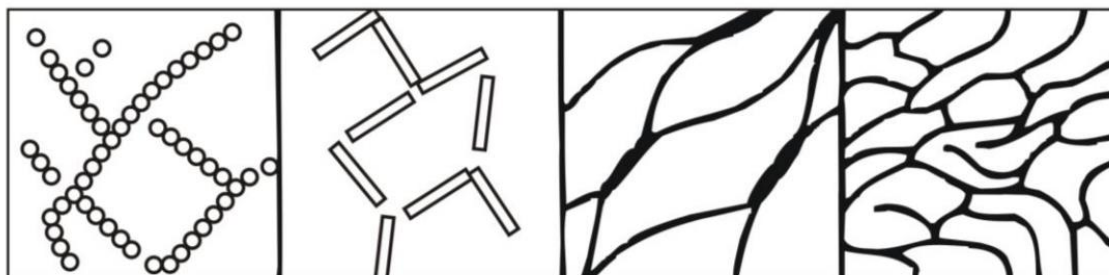
- K použitiu FCS mikrореолógie je potreba len malý objem skúmanej vzorky, o veľkosti približne 10 μl. Z tohto dôvodu je fluorescenčná korelačná spektroskopia vhodnou metódou pre skúmanie drahých biologických materiálov, dostupných len v obmedzenom množstve. Malý je taktiež objem pridávanej fluorescenčnej sondy, ktorý má pri konfokálnom objeme 1 femtoliter veľkosť niekoľkých nanomólov [29].
- FCS mikrореолógia meria procesy v časovom rozsahu niekoľkých mikrosekúnd až stoviek sekúnd. Toto rozpätie je ovplyvnené dobou, ktorú strávi fluorescenčná častica v konfokálnom objeme. Keďže sa jedná o translačnú difúziu fluorescenčnej častice, je jej pohyb na základe Stokes – Einsteinovej rovnice ovplyvnený teplotou, veľkosťou ale aj viskozitou prostredia [34].

Nevýhody FCS mikrореолógie:

- Jednou z nevýhod FCS mikrореолógie je komplikovaná analýza nameraných dát.
- FCS mikrореолógiu možno použiť len u vzoriek, ktoré vykazujú fluorescenciu, či už prirodzenú alebo boli fluorescenčne označené. Fluorescenčné značky však po určitej dobe strácajú svoju schopnosť fluoreskovať. Tento jav sa nazýva „fotovybledovanie“ [35].

2.7 Gély

Gély sú disperzné koloidné systémy, v ktorých sú disperzné častice spojené do trojrozsomernej sieťovej štruktúry rozprestierajúcej sa v celom disperznom prostredí. Tento proces popisuje dej zvaný gelácia. Spojené sú nie len disperzné častice, ktoré strácajú schopnosť voľne sa pohybovať v danom médiu, ale aj disperzné prostredie. Sily pútajúce disperzné častice medzi sebou sú adhézne sily. Moment, v ktorom sa vytvorí neprerušovaný reťazec nachádzajúci sa v celom objeme pripravovaného média sa nazýva bod gelácie [36].



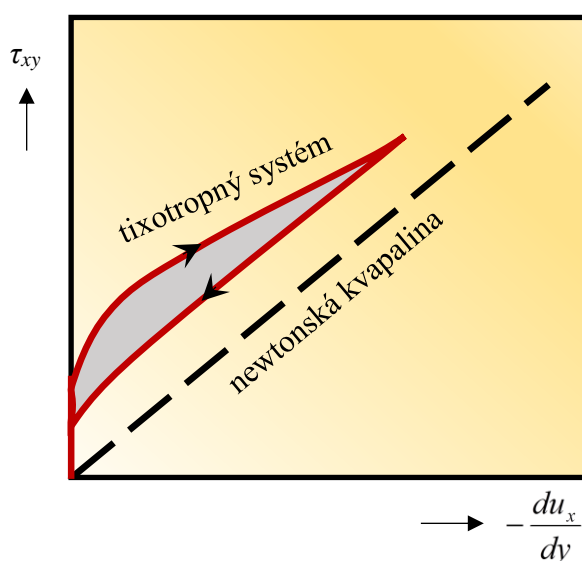
Obrázok 8: Vnútoraná štruktúra gélov [37].

Podľa chovania gélu vo vysušenom stave sa tieto disperzné systémy delia do dvoch skupín:

- Reverzibilné gély, ktoré pri vysušaní zmenšujú svoj objem, čím vznikajú kompaktné xerogély. Vzniknutý xerogél však možno znovu premeniť na pôvodný lyogél jeho nabobtnaním, čo je proces prijímania disperzného prostredia. Takéto chovanie vykazujú najmä makromolekulárne gély [38].
Reverzibilné gély majú priestorovú štruktúru tvorenú sieťou makromolekulárnych reťazcov, ktoré sú prostredníctvom síl spojené v miestach zvaných uzly, uzlové body alebo uzlové oblasti. Jedná sa o sily chemického alebo fyzikálneho charakteru.
 - Pokiaľ je gél vytvorený na základe chemickej reakcie, hovoríme o kovalentne zosieťovaných géloch, géloch obsahujúcich kovalentné väzby. Tieto gély vznikajú dvoma spôsobmi a to nelineárnou kondenzáciou či adičnou polymeráciou monomerov alebo z lineárnych polymérov, ktoré sú zasieťované v prítomnosti vhodného činidla. Gély vytvorené chemickou reakciou vykazujú vysokú pevnosť [38].
 - Druhou skupinou sú gély fyzikálneho charakteru, ktoré vznikli pôsobením fyzikálnych síl (van der Waalových síl, dipolárnych síl alebo vodíkových väzieb). Pri týchto procesoch sa uzly netvoria na koncoch reťazcov, ale medzi ľubovoľnými úsekmi makromolekúl, pričom jedna makromolekula môže byť zapojená do niekoľkých uzlových oblastí. Voľné časti reťazca si zachovávajú svoju ohybnosť i tepelný pohyb a združujú sa pri znížení afinity vysokomolekulárnej látky k rozpúšťadlu. Asociácia reťazcov môže nastať napríklad znížením teploty, zvýšením koncentrácie či zhoršením kvality rozpúšťadla [38].
- Ireverzibilné gély vznikajú zosieťovaním lyofóbnych sólov. Ich objem po vysušení disperzného prostredia ostáva približne rovnaký ako mal pôvodný gél, avšak objavuje sa pórozita. Pri opätovnom styku s disperzným prostredím sú schopné spätne nasáť kvapalinu, ale pôvodný lyogél sa tým nevytvorí [38].

2.7.1 Vlastnosti gélov

- Elastická vodivosť a difuzivita. Molekuly pohybujúce sa v disperznom prostredí gélu pomedzi sieťovú štruktúru vykazujú rovnako rýchly pohyb ako je pohyb týchto molekúl v sóle. Elektrická vodivosť gélov je teda rovnaká ako jeho vodivosť v sóle. Taktiež difuzivita nízkomolekulárnych látok je v géle len nepatrne menšia ako v sóle a to i napriek rastúcej viskozite gélovej sústavy [38].
- Starnutie gélu. Je to jav, pri ktorom nastáva samovoľné vytekание kvapaliny z gélu, ktoré je spôsobené nárastom množstva spojov sieťovej štruktúry, teda zmršťovaním siete. Tento proces sa nazýva synereze a vyskytuje sa u gélov, ktoré nie sú v termodynamickej rovnováhe. V priebehu starnutia gélu sa zhoršujú jeho mechanické vlastnosti. Starnutie je podporené zvýšením teploty alebo prídavkom elektrolytu [39].
- Tixotropia. U mnohých gélov môžeme pozorovať, že reologická vlastnosť niektorých systémov, ktoré boli podrobené šmykovému namáhaniu (napríklad trepanie alebo miešanie), vykazujú zdanlivú viskozitu, ktorá sa v priebehu času znižuje. Jedná sa o pseudoplastické systémy, ktorých zdanlivá viskozita klesá pri rastúcom napätí a systémy plastické, ktoré sa pôsobením napätia elasticky deformujú. Pokiaľ nie je gél vystavený pôsobeniu vonkajších mechanických síl, pôvodná štruktúra sa obnovuje a viskozita sa vracia na svoju pôvodnú hodnotu. Vzniká hysteréza slučka, čo značí že tvar tokovej krivky pri pravidelnom zvyšovaní napätia neodpovedá priebehu tokovej krivky pri následnom znižovaní napätia [38].



Obrázok 9: Priebeh tokovej krivky pre tixotropnú a newtonsku kvapalinu [38].

- Mechanické vlastnosti. I napriek svojej štruktúre vykazujú gély mechanické vlastnosti typické pre tuhé látky. Pri pôsobení tangenciálneho napätia sa chovajú ako elastické tuhé telesá, pričom hodnota kritického napätia je priamo úmerná koncentrácii väzieb a ich pevnosti. Ako značne elastické sa chovajú gély reverzibilné, obsahujúce malý počet väzieb v jednotke objemu. S rastúcim počtom väzieb rastie tuhosť gélu a zároveň klesá možnosť zmeny jeho tvaru. Fyzikálne gély vykazujú tixotropné vlastnosti,

čo znamená, že pri zatrepaní s gélom sa jeho štruktúra premení na sól a to v dôsledku slabých príťažlivých síl, ktoré zanikajú [38, 40].

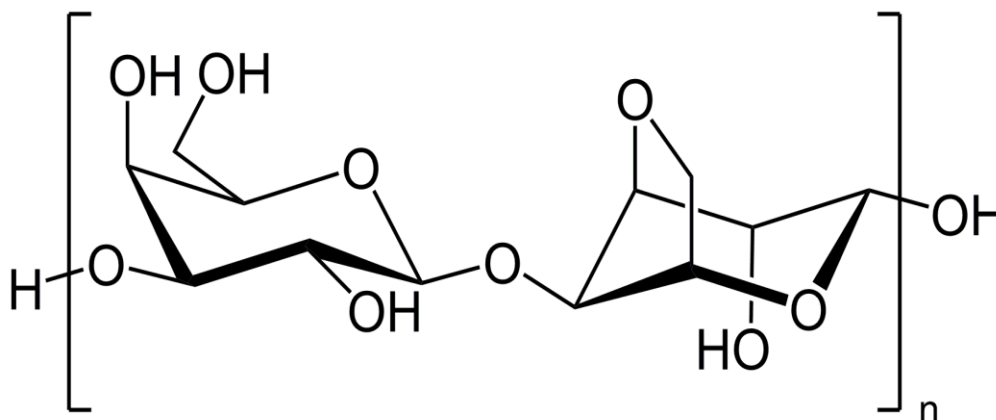
2.7.1.1 Agaróza

Agaróza je lineárny polysacharid, ktorý sa získava z červených morských rias typu Agarophyte ako súčasť agaru. Tvorená je opakujúcimi sa jednotkami agarobiózy, čo sú striedajúce sa galaktózové a 3,6-anhydrogalaktózové podjednotky (Obrázok 10). Jedná sa o nenabitý polysacharid, ktorý však môže obsahovať prímеси sulfátových a pyruvátových skupín [41].

Dostupná je vo forme bieleho prášku rozpustného pri vyšších teplotách. Najpoužívanější druh agarózy sa rozpúšťa pri teplote cca 85 °C. Pri ochladzovaní roztoku agarózy dochádza k tvorbe gélovej štruktúry. Proces gelácie súvisí so zmenou chemickej štruktúry. Agarózové reťazce sa spájajú do helikálnej štruktúry, ktoré agregujú do tridimenzionálnych sietí. Nadšroubovicová 3D štruktúra je stabilizovaná pôsobením vodíkových väzieb. Dochádza teda k tvorbe fyzikálne zosieťovaného gélu, ktorý opätovným zahriatím prechádza v sól. Ide o termoreverzibilný polysacharid [42].

Medzi významné vlastnosti agarózových gélov patrí okrem termoreverzibility aj synerezia, teda samovoľné vytlačovanie vody a hysterezia, ktorá nastáva pri zmene teploty média [43].

Agaróza sa často používa v molekulárnej biológii, pre separáciu molekúl použitím elektroforézy. Vhodnými látkami sú preto, že vykazujú malé interakcie so separovanými látkami a vyznačujú sa dobrou vodivosťou. Agarózové gély môžu byť použité i ako stacionárna fáza v gélovej permeačnej chromatografii. Ďalej nachádza agaróza uplatnenie ako živné médium pri kultivácii mikroorganizmov, z dôvodu vysokého obsahu vody a taktiež ako scaffoldy v tkanivovom inžinierstve. Hydrogél poskytuje bunkám mechanickú oporu a voda, ktorú zadržiava, je dôležitá pre rast buniek a tkanív. Agaróza sa využíva i v potravinárstve vo forme menej koncentrovaných gélov [44].



Obrázok 10: Štruktúrny vzorec agarózy [45].

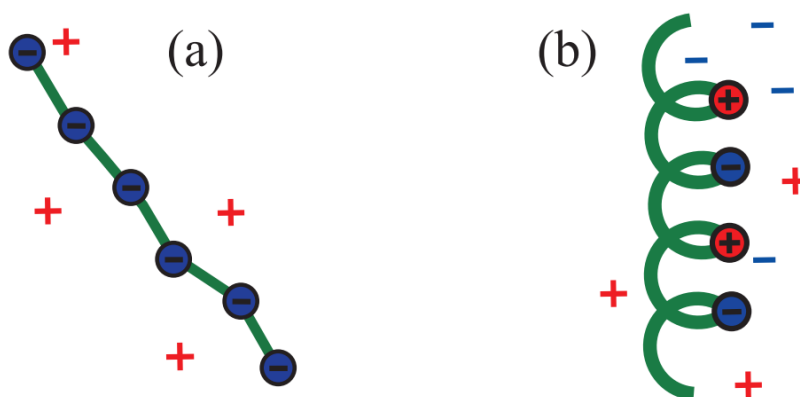
2.8 Polyelektrolyty

Polyelektrolyty sú vysokomolekulárne látky, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú postranné skupiny schopné elektrolytickej disociácie. Disociovaním tak vzniká makroión, obsahujúci veľký počet elementárneho náboja a ekvivalentný počet protiiónov, iónov s opačným nábojom k makroiónu. Môžu vzniknúť buď makroanión alebo makrokatión. Podľa povahy disociácie sa polyelektrolyty delia na:

- polyelektrolyty obsahujúce kyslé skupiny, napríklad $-\text{COO}^-$, $-\text{SO}_3^-$. Zatiaľ čo silné kyslé skupiny disociujú úplne, slabo kyslé skupiny disociujú len čiastočne. Takéto látky sa chovajú skoro ako nepolyelektrolyt.
- polyelektrolyty bážické, napríklad $-\text{NH}_3^+$.
- amfotérne polyelektrolyty nesúce vo svojej štruktúre kyslé ale aj zásadité skupiny, napríklad bielkoviny [36, 46].

Dve rovnaké skupiny v jednej molekule majú rozdielnu hodnotu disociačnej konštanty, pokiaľ má ich najbližšie okolie rôznu chemickú štruktúru. Okrem toho môže dôjsť aj k vzájomnému ovplyvňovaniu skupín a to v prípade, že nie sú od seba dostatočne vzdialené. Špeciálnou skupinou polyelektrolytov sú tzv. polyamfolyty, ktoré disociujú rôzne v závislosti na pH roztoku. Pri vysokej hodnote pH sú disociované kyslé skupiny, pri nízkom pH disociujú iba zásadité skupiny a pri stredných hodnotách pH dochádza k disociácii kyslých, ale aj zásaditých skupín. Moment, v ktorom je počet disociovaných kladných a záporných skupín rovnaký sa nazýva izoelektrický bod. Celkový náboj molekuly je vtedy nulový [46].

Makromolekuly, ktoré obsahujú iba náboje rovnakého znamienka existujú vo vodných roztokoch vo forme natiahnutého reťazca, nemajú tendenciu zvinovať sa do kľbka. Tento jav je zapríčinený veľkými odpudivými silami medzi súhlasne nabitými skupinami. Tieto sily sú však zoslabované prítomnosťou protiiónov. Pridaním nízkomolekulárnej látky do roztoku polyelektrolytu dochádza k rastu iónovej sily roztoku a môže sa uplatniť vplyv tepelného pohybu – dôjde k zvinutiu makromolekuly do kľbka. Zvinutie makromolekuly môže spôsobiť už malé množstvo elektrolytu (Obrázok 11). Typické chovanie polyelektrolytu vykazujú látky, ktoré majú na kostre viac ako jednu ionizovanú skupinu na desať monomérnych jednotiek [47, 48].



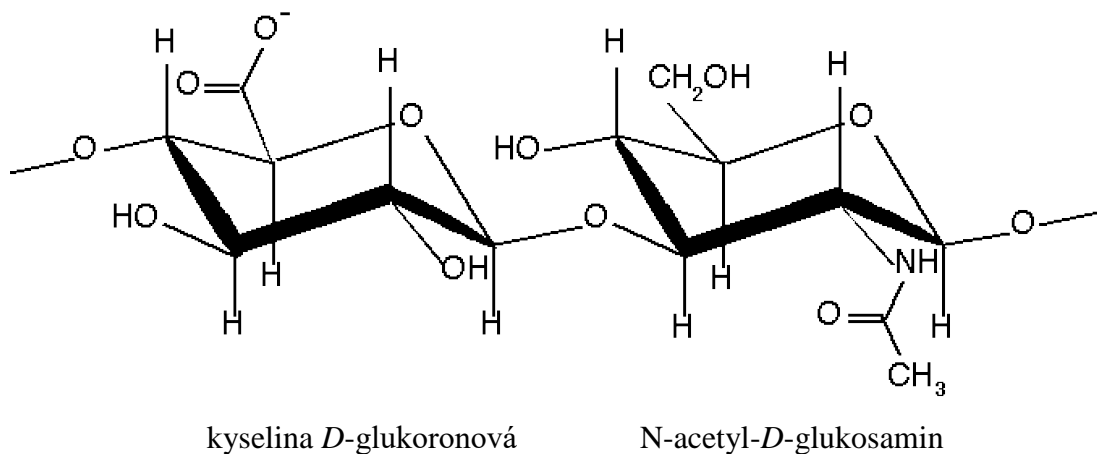
Obrázok 11: Tvar lineárnych polyelektrolytov v roztoku. a) lineárna makromolekula so súhlasným nábojom bez nízkomolekulárneho elektrolytu b) amfoterná makromolekula v izoelektrickom bode [47].

Vlastnosti polyelektrolytov v roztoku sú ovplyvňované nasledujúcimi faktormi: koncentráciou polyelektrolytu, frakciou disociovaných iónových skupín, hustotou náboja na reťazci a jeho vzájomná vzdialenosť a geometrické usporiadanie, kvalita rozpúšťadla, dielektrická konštanta roztoku, prítomnosť nízkomolekulárnych solí a ich koncentrácia [48, 49].

2.8.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je polyelektrolyt, ktorý sa obvykle vyskytuje vo forme sodnej či draselnej soli. Je to telu vlastná látka, ktorá sa nachádza v synoviálnej tekutine, v koži alebo zaisťuje hladkosť pohybu kĺbových svalov. Izolovaná je z pupočnej šnúry alebo kohútich hrebeňov [50].

Kyselina hyaluronová (HyA) pozostáva z opakujúcich sa disacharidových jednotiek, tvorených kyselinou *D*-glukoronovou a *N*-acetyl-*D*-glukosaminom, spojených striedajúcimi sa β -1,4 a β -1,3 glykosidickými väzbami (Obrázok 12). Patrí medzi glykosaminoglykany, ktoré však vo svojej štruktúre nemajú kovalentne viazané peptidy. V pevnom stave sa vyskytuje vo forme bieleho prášku, vo vodných roztokoch tvorí stabilné terciárne štruktúry. Má schopnosť vytvárať vysoko viskózne roztoky. Existuje niekoľko HyA polymérov, ktoré sa líšia vo svojej konfigurácii a tvare, v závislosti od ich veľkosti, koncentrácie soli, pH alebo pripojených kationov. Bežne sa vyskytujúci glykosaminoglykan sa vyznačuje vysokou molekulovou hmotnosťou, ktorá môže mať až milión Daltonov. Kyselina hyaluronová tvorí po reakcií so sieťovacím činidlom hydrogély a je silno hydrofobická [51, 52].



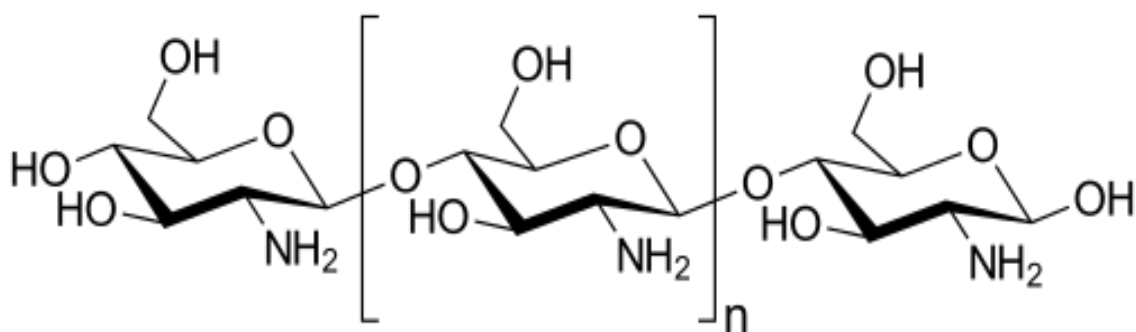
Obrázok 12: Štruktúrny vzorec kyseliny hyaluronovej [53].

Keďže kyselina hyaluronová vykazuje vynikajúce hydrofobické vlastnosti a je to telu vlastná látka, nachádza svoje uplatnenie v kozmetickom priemysle, v ktorom sa používa ako súčasť hydratačných krémov či krémov na vyhladzovanie vrások. Vo farmácii sa používa ako látka podporujúca hojenie rán, ako lubrikant a zvlhčovač oka alebo prípravok pre ciele distribúciu liečiv na liečbu rakovinotvorných buniek [54].

2.8.2 Chitozán

Chitozán je lineárny polysacharid, ktorý sa získava deacetyláciou chitínu. Môžeme ho nájsť v exoskelete článkonožcov alebo v bunkových stenách húb či kvasiniek vo forme kryštalických mikrofibril. Chitín je taktiež súčasťou hmyzu, mäkkýšov, schránok kôrovcov a ďalších organizmov. Práve preto je to druhý najrozšírenejší polymér na Zemi [55].

Jeho chemická štruktúra je tvorená N-acetylglukosaminom, ktorý je čiastočne deacetylovaný (Obrázok 13). Práve stupeň deacetylácie je jedna z najdôležitejších charakteristík chitozánu. Pohybuje sa v rozmedzí 60–100 % a určuje vlastnosti chitozánu, ako je napríklad rozpustnosť alebo biodegradabilita. Chitozán je v porovnaní s chitínom reaktívnejší a to vďaka prítomnosti voľnej aminoskupiny. Prítomnosť tejto aminoskupiny dáva chitozánu schopnosť viazať ióny kovov a tvoriť s nimi komplexy. Všeobecne platí, že chitozán je vo vode nerozpustný, dobre sa však rozpúšťa v slabých kyselinách, v ktorých sa chová ako polykation na základe čoho je chitosan zaradený do skupiny kationaktívnych biopolymérov. Jedná sa o kyselinu octovú, mravenčiu a citrónovú. Dobrá rozpustnosť chitozánu v kyslom prostredí je spôsobená protonizáciou voľnej aminoskupiny na druhom uhlíkovom atóme. Okrem slabých kyselín sa chitozán rozpúšťa i v dimethylsulfoxide (DMSO) a p-toluensulfónovej kyseline. Vo forme rozpustnej vo vodných roztokoch a za prítomnosti sieťovadla môže chitozán vytvárať gély, ktoré pohltia 6 až 8-krát viac tekutiny, ako je jeho vlastná hmotnosť [56, 57].



Obrázok 13: Štruktúrny vzorec chitosanu [58].

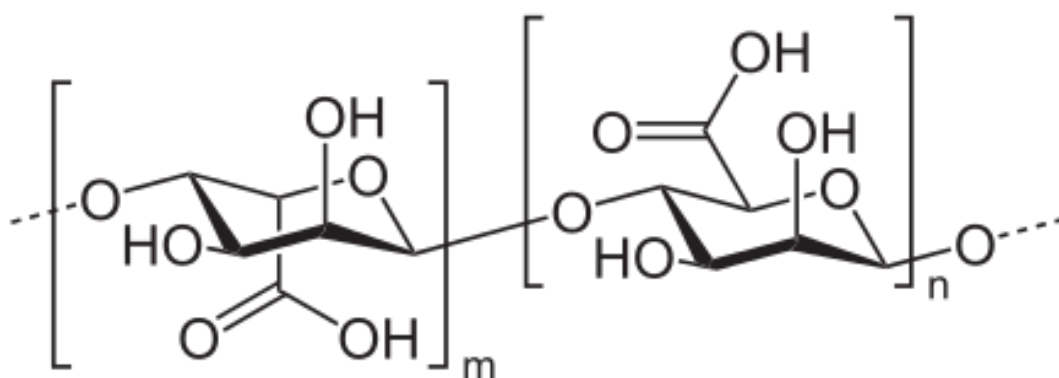
Chitozán je jedinečný polymér kvôli jeho kladne nabitým iónovým skupinám vďaka čomu má veľký potenciál v mnohých aplikáciách. Svoje uplatnenie našiel vo farmaceutickom priemysle a biomedicíne, kde slúži ako médium pre ciele doručovanie a uvoľňovanie liečiv. Významná je taktiež jeho antimikrobiálna aktivita proti gramnegatívnym a grampozitívnym baktériám a hubám pri hodnote pH menej ako 6. Nízkomolekulárny chitozán vykazuje i protinádorovú aktivitu. Ďalej sa chitozán využíva v potravinárstve ako doplnok na zníženie hladiny cholesterolu či konzervačné činidlo a v poľnohospodárstve ako prípravok na ochranu rastlín či k podpore ich rastu. Vďaka jeho schopnosti viazať kovové ióny sa chitozán používa aj ako flokulačné činidlo na čistenie odpadových vôd [55, 58].

2.8.3 Alginát

Alginát je prirodzene sa vyskytujúci aniónový polysacharid, ktorý sa získava z hnedých morských rias typu *Phaeophyceae*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata* a iných. Ďalšou možnosťou jeho vzniku je jeho syntéza z baktérií rodu *Azotobacter* a *Pseudomonas* [59].

Chemická štruktúra alginátu obsahuje určité množstvo β -D-manurovej kyseliny a α -L-glukoronovej kyseliny, ktoré sú spojené β -1,4 glykosidickými väzbami (Obrázok 14). Algináty získané z rôznych zdrojov sa líšia obsahom kyselín a v dĺžke každého bloku. Taktiež môže byť táto látka pripravená v širokom rozmedzí molekulových hmotností ($32\text{--}4\,000\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Alginát je vo vode rozpustná látka tvoriaca gély, nerozpúšťa sa v etanole či v étere. Alginátové hydrogély sa pripravujú rôznymi spôsobmi sieťovania molekúl, napríklad iónovým zosieťovaním, kedy sa do pripravené roztoku pridáva dvojmocný kation Ca^{2+} , kovalentným zosieťovaním za použitia poly(etylénglykol)diaminom, tepelne alebo ďalším iným spôsobom. Zvýšenie molekulovej hmotnosti alginátu môže zlepšiť fyzikálne vlastnosti výsledných gélov [59, 60].

Alginát je biomateriál, ktorý našiel početné uplatnenie v biomedicíne a tkanivovom inžinierstve vďaka svojim priaznivým vlastnostiam, ako sú biokompatibilita, malá toxicita, relatívne nízka cena a ľahkosť tvorby gélovej štruktúry. Alginátové hydrogély boli obzvlášť atraktívne pri hojení rán či podávaní liekov. Ďalej sa alginát používa v potravinárstve ako stabilizátor, zahusťovadlo či emulgátor [59, 60].

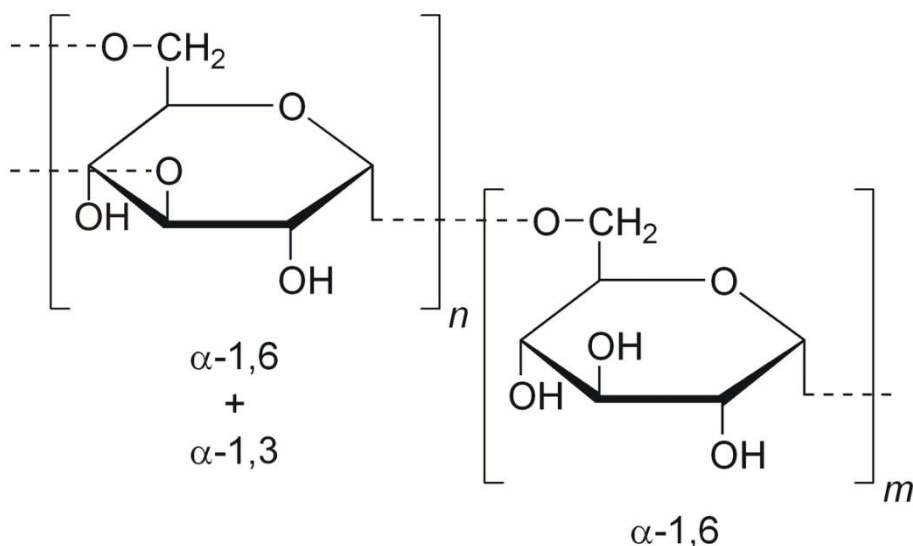


Obrázok 14: Štruktúrny vzorec alginátu [61].

2.8.4 Dextrán

Dextrán je polyelektrolyt, ktorý patrí do skupiny vetvených polysacharidov. Získava sa pôsobením baktérie *Leuconostoc mesenteroides* na molekuly sacharózy. Enzymatický aparát tejto baktérie spôsobuje štiepenie sacharózy a následne viaže voľné molekuly glukózy do novo vznikajúceho dextransového reťazca.

Chemická štruktúra dextransu teda pozostáva z molekúl glukózy, ktoré môžu byť viazané α -1,6; α -1,3 väzbami. Ako môžeme vidieť na obrázku (Obrázok 15) v molekule dextransu však najviac dominuje spojenie glukózových jednotiek väzbou α -1,6.



Obrázok 15: Štruktúrny vzorec dextránu [76].

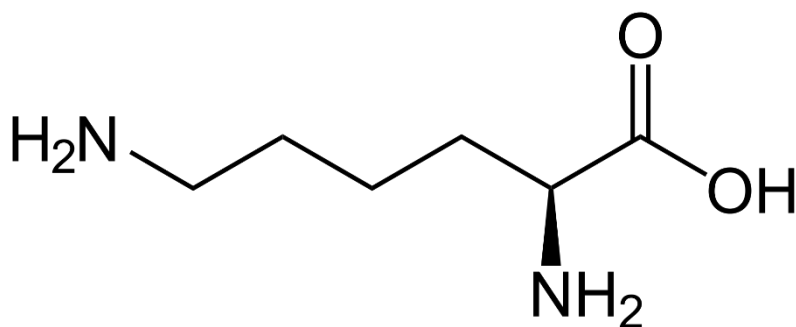
Medzi dôležité vlastnosti dextránu patrí jeho stabilita, kedy sa za vhodných podmienok (dôkladne vysušená prášková forma dextránu, skladovaná za laboratórnej teploty a bez prístupu vzduchu) môže uchovávať až po dobu piatich rokov. Dextrán patrí i medzi látky, ktoré sú dobre rozpustné vo vode a v elektrolytických roztokoch, čím vytvárajú číre a stabilné roztoky. Hodnota pH zvoleného rozpúšťadla nemá vplyv na rozpustnosť dextránu. Je biokompatibilný a biodegradabilný. Medzi jeho nežiadúce vlastnosti sa zaraďuje schopnosť molekúl dextránu absorbovať vlhkosť zo vzduchu. Keďže molekuly dextránu patria medzi zdravotne nezávadné látky pre ľudský organizmus, svoje uplatnenie nachádzajú v medicíne, kde sa využívajú ako náhrada krvnej plazmy, v ktorej zastávajú funkciu bielkovín [76].

2.8.5 L-lysin

Lysin patrí do skupiny esenciálnych aminokyselín, ktoré sú buď syntetizované v rastlinách, alebo sa vyrábajú priemyslovou cestou za pomoci mikrobiálnych technológií. Hlavnou surovinou pri mikrobiálnej výrobe lysinu je melasa. Pri chemickej syntéze sa využívajú suroviny ako kaprolakton alebo akrylonitril.

Molekula lysinu obsahuje v postrannom reťazci primárnu aminoskupinu, ktorá jej dodáva bázičský charakter. Keďže molekula lysinu má vo svojej štruktúre asymetrický atóm uhlíku, existuje v dvoch konfiguráciách – *D* a *L* forme. V bielkovinách sa však nachádza iba *L* forma (Obrázok 16).

Lysin je vo vode rozpustná látka, ktorá je biologicky odbúrateľná a netoxická pre človeka. V ľudskom tele zohráva dôležitú úlohu, pretože jeho reťazce tvoria priečne kovalentné väzby, ktoré spevňujú kolagénové vlákna. Využitie nachádza taktiež v potravinárstve ako konzervačné činidlo [77].

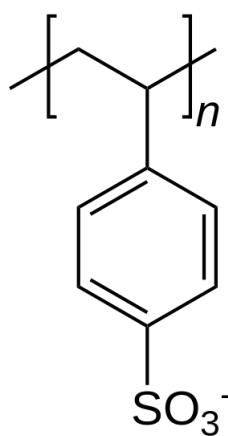


Obrázok 16: Štruktúrny vzorec *L*-lysinu [77].

2.8.6 Polystyrén sulfonát

Polystyrén sulfonát (PSS) je syntetický polymér, ktorý vo svojej chemickej štruktúre obsahuje kyslé sulfonátové alebo sulfónové funkčné skupiny (Obrázok 17). Je odvodený od polystyrénu. Polystyrén sulfonát je v nezosieťovanej forme látka dobre rozpustná vo vode. Pokiaľ dôjde k zosieťovaniu polyméru, látka stráca schopnosť rozpúšťať sa vo vodnom prostredí.

PSS je látka, ktorá nachádza uplatnenie v oblasti medicíny ako draslíkové spájadlo v akútnych a chronických ochoreniach ľadvín. Taktiež sa podáva ľuďom s abnormálnou hladinou draslíku v krvi [78].



Obrázok 17: Štruktúrny vzorec polystyrén sulfonátu [79].

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Mikroreológia je technika, ktorá sa stále viac používa na skúmanie viskoelastických vlastností komplexných tekutín a to neinvazívne, sledovaním pohybu vložených častíc. Rozdeľuje sa do dvoch kategórií: aktívnych techník a pasívnych techník. Jednou z najpoužívanejších metód z oblasti pasívnej mikroreológie je jednočasticová mikroreológia (PTM), ktorá sleduje trajektórie začlenených častíc, spôsobené Brownovým pohybom.

Moschakis T. a spol. skúmali geláciu kazeinátu sodného spôsobenú acidifikáciou, využitím klasickej reológie a videomikroreológie, za pomoci konfokálneho mikroskopu. Pri hodnotách pH v blízkosti izoelektrického bodu pI kazeínu, pri ktorých sa stala gelácia pozorovateľná nie len pri reologických meraniach, ale aj pod konfokálnym mikroskopom sa zistilo, že všetky vložené častice mali tendenciu priľnúť k sieti, adsorbovali sa teda na novovytvorenú proteínovú sieť. V priebehu okysľovania sa tak molekuly kazeínu stali za určitých podmienok hydrofóbne. Reologické i mikroreologické merania boli urobené pri rovnakých frekvenciách. Výsledkom skúmania bolo, že mikroreologické hodnoty modulov boli len mierne nižšie než makroskopicky stanovené hodnoty. Z dát nameraných pomocou oboch techník boli vypočítané body gelácie. Zistilo sa, že tieto stanovené hodnoty bodov gelácie sa takmer zhodujú. Mikroreologické sledovanie častíc má však väčšiu citlivosť a môže detekovať zmeny vo vnútornej štruktúre systému ešte pred tým, než sú registrované pri klasickej reologickom meraní [64].

Ďalej sa skupina pod vedením **Moschakis T.** zaoberala sledovaním sol – gél prechodu β -glukánu izolovaného z roztoku jačmeňa. K štúdiu použili konvenčnú reológiu a jednočasticovú mikroreológiu. Charakterizácia primárnej štruktúry izolátu β -glukánu bola urobená pomocou metódy vysokotlakej kvapalinovej chromatografie. β -glukánové gély tvrdnú pri teplote 25 °C a skúmaním mikroreológie i reológie týchto gélov sa odhalilo, že so zvyšujúcou sa koncentráciou polysacharidu sa doba tvorby gélu znížila, zatiaľ čo rýchlosť gelácie a pevnosť gélu sa zvýšila. Ďalej sa zistilo, že s rastúcou koncentráciou β -glukánu sa zvyšuje i bod topenia. Metóda jednočasticovej mikroreológie preukázala vyššiu citlivosť a je schopná zmapovať molekulárne usporiadanie a štruktúrne heterogenity na úrovni mikrometrov. Okrem toho je táto metóda schopná odhaliť i zmeny v štruktúrovaní systému skôr, než by to dokázalo použitie klasickej reológie [65].

Nixon R. a spol. vykonávali mikroreologické testy na povrchu Delefilconu, používaného pri výrobe kontaktných šošoviek. Jedná sa o silikón – hydrogélový materiál obsahujúci fosfatidilcholí. Mikroreologické častice boli vložené medzi úseky šošovky o určitej veľkosti. Úseky šošovky boli udržiavané v prostredí deionizovanej vody. Vložené častice boli snímané pomocou jednočasticovej mikroreológie pri zväčšení mikroskopu až 90-krát. Pre dráhu každej častice bola vypočítaná priemerná hodnota stredného kvadratického posunu častíc (MSD). Sledované častice vykazovali výrazný pohyb, premiestňovali sa do vzdialenosti 50 – 100 nm za čas kratší ako 2 sekundy. Z hodnôt MSD bol vypočítaný taktiež elastický a viskózný modul, čo odhalilo slabú frekvenčnú závislosť, a to medzi 10 – 100 radiánov za sekundu a modul pružnosti sa líšil v rozmedzí hodnôt 0,3 až 1 Pa. Z teórie elasticity pružných polymérov preto predpokladali, že obsah vody v najkrajnejšej oblasti Delefilconu, vrstvy na povrchu gélu, je viac ako 99 %. Ryan Nixon a spol. tak zistili, že vlastnosti materiálu gélových vrstiev na povrchu kontaktných šošoviek sú podobné ako vlastnosti iných gélov o nízkej koncentrácii a stanovený elastický modul

pri krajnom povrchu je viac ako 1000-krát nižší v porovnaní s priemerným elastickým modulom celého povrchu gélovej vrstvy [66].

A.M. Corrigan a A.M. Donald použili jednočasticovú mikrореológiu k štúdiu tvorby gélovej siete v mliečnej bielkovine β -laktoglobulín pri 80 °C a pH 2. Za týchto podmienok proteínové agregáty vytvárajú vláknité štruktúry, známe ako amyloidné vlákna, ktoré sa môžu ďalej spájať do pružných sietí. Využitím metódy jednočasticovej mikrореologie bolo pozorované, že gély sa tvoria už pri nižších koncentráciách ako tých, ktoré boli stanovené reologicky. Je to z toho dôvodu, že reológia skúma vzorku z makroskopického hľadiska, zatiaľ čo pomocou mikrореologie nazrieme do vnútornej štruktúry sledovaného materiálu. Pri klasickej reológii by mohlo dôjsť i k narušeniu tvorby vlákna či samotnej gélovej siete. Z nameraných hodnôt MSD počas inkubácie bolo možné stanoviť kritický relaxačný exponent zhodný s ostatnými gélmi, ktoré sú vytvorené z biopolymérov [67].

Viacnásobné sledovanie častíc (MPT) sa používa na charakterizáciu viskoelastických vlastností biomateriálov a syntetických polymérnych gélov v blízkosti prechodu kvapalina – pevná látka. Vložené častice sa dispergujú v gélových prekurzoroch a meria sa ich dynamická odozva počas vzniku gélovej štruktúry. Viacnásobné sledovanie častíc je v podstate totožné s jednočasticovou mikrореológiou. **Larsen T. a spol.** interpretovali dynamiku vzorku použitím viacnásobného sledovania častíc a zovšeobecnenej Stokes – Einsteinovej rovnice (GSER). Skúmaným materiálom bol MTHR peptid, pozostávajúci z valínových a lysinových zvyškov obklopujúcich tetrapeptidovú sekvenciu s vysokou náchylnosťou k β -rotácií a polyakrylamid. Ukázali, že reologické a mikrореologické výsledky sa zhodovali, vrátane bodu gelácie, kritických exponentov a viskoelastickej odozvy materiálu pri tvorbe gélovej siete. Tieto experimenty poskytujú cenné poznatky o reologickej štruktúre a kinetike látok schopných vytvoriť gél [68].

Wehrman a spol. charakterizovali dynamicky sa rozvíjajúci koloidný gél, hydrogenovaný ricínový olej (HCO). Kostra sledovaného materiálu je tvorená vláknitými koloidmi, povrchovo aktívnej látky (alkylbenzensulfonát) a vody. Tento gél podlieha kritickému prechodu, degradácii a formácii v závislosti od osmotického tlaku. K meraniu vlastností materiálu bolo použité viacnásobné sledovanie častíc, vďaka ktorému Wehrman a spol. zistili, že gély HCO sa vyvíjajú rôznorodo a táto heterogenita je charakterizovaná priestorovo i časovo. Použitie MPT ďalej poskytuje doplnkové informácie o unikátnom prostredí gélu [69].

Ďalšou technikou z oblasti pasívnej mikrореologie, ktorá využíva iba Brownov pohyb začlenených častíc je dynamický rozptyl svetla (DLS). **W. Liang a spol.** študovali viskoelastické vlastnosti hydrogélú vytvoreného z deoxycholátu sodného (NaDC) použitím mikrореologie dynamického rozptylu svetla. Hydrogél NaDC bol vytvorený samosporiadaním vo vodnom roztoku chloridu sodného pri pH 7. Počas priebehu gelácie boli do vnútra vzorky vložené mikrореologické polystyrénové častice o veľkosti niekoľko nanometrov, ktoré slúžili ako sonda pre dynamický rozptyl svetla a doxorubicin hydrochlorid (DOX). Zistilo sa, že viskózna zložka dominuje v nízkych i vysokých frekvenciách, zatiaľ čo elastická zložka dominuje v strednej frekvenčnej oblasti. Taktiež bola odhadnutá veľkosť dutín nanovláknien. Ďalej sa ukázalo, že vložený DOX sa môže pomaly uvoľňovať z hydrogélú do vodného roztoku. Profil uvoľňovania DOX závisí od hodnoty pH roztoku [70].

De Bruyn a spol. študovali viskoelastické vlastnosti a relaxačnú dynamiku roztoku asociatívneho polyméru s postranným reťazcom. Jedná sa o hydrofóbne modifikovanú hydroxyetylcelulózu (hmHEC). K meraniu bol použitý dynamický rozptyl svetla i klasická reológia. Pohyb vložených častíc v roztoku hmHEC je difúzny v krátkych časoch a subdifúzny v stredných a dlhých časoch. Subdifúzný pohyb v dlhých časoch nebol pozorovaný v paralelných experimentoch na nemodifikovanom roztoku hydroxyetylcelulózy (HEC). Dynamický rozptyl svetla samotných molekúl ukazuje, že uvoľňovanie reťazca v hmHEC je riadené pomalým procesom závislým od koncentrácie, z dôvodu veľkej asociatívnej sieťovej štruktúry, zatiaľ čo pri HEC dominuje pri uvoľňovaní reťazca rýchla Rouseova dynamika, ktorá nie je závislá na koncentracii [71].

S. Amin a spol. preukázali použitím nízko-frekvenčnej ramanovej spektrometrie a mikroreológie dynamického rozptylu svetla súvislosť medzi geláciou a rastúcim množstvom molekúl vody, uväznených v nanopóroch agarózového gélu. Táto práca pojednáva a potvrdzuje, že prejav jednotlivých molekúl vody môže byť pozorovaný už počas chladnutia, tvorby gélu. Ešte dôležitejšie je, že práca poukazuje na schopnosť spomínaných techník poskytnúť nové pohľady a priamu súvislosť medzi medzimolekulárnymi interakciami a rozvíjajúcou sa reologickou odozvou v systémoch tvoriacich gél [72].

De Bruyn a spol. modelovali obmedzenú difúziu malých vložených častíc blízko géloveho prechodu, vykonaním simulácie „Monte Carlo“ v modeli perkolácie. Z nameraného stredného kvadratického posunu častíc bol použitím zovšeobecnenej Stokes – Einsteinovej rovnice vypočítaný elastický modul a efektívna viskozita sledovaného vzorku. Výsledky ukazujú prechod od viskózneho k elastickému správaniu, teda vznik gélu. Zistilo sa, že zovšeobecnená Stokes – Einsteinová rovnica v týchto prípadoch neplatí, z dôvodu vytvorenia gélovej siete vo vzorke. Táto sieť bráni pohybu častíc a môže zapríčiniť až ich uväznenie v polymérnom reťazci gélu [73].

Na inom princípe pracuje fluorescenčná korelačná spektroskopia (FCS), ktorá nesníma pohyb začlenených častíc, ale sleduje kolísanie intenzity fluorescencie difundujúcej látky vo veľmi malom pozorovanom objeme. **E. Schuster a spol.** použili alginátové gély s prirodzene sa vyskytujúcimi makroskopickými kapilármi ako modelový systém pre štúdium vzájomného pôsobenia laminárneho prúdenia a difúzie rozpustenej látky. Alginátové gély boli vytvorené vonkajším pridaním iónov, ktoré podporujú sieťovanie gélu a pridaním fluorescenčných sond. K skúmaniu gélu boli použité tri analytické metódy, konkrétne konfokálna skenovacia mikroskopia, transmisná elektrónová mikroskopia a fluorescenčná korelačná spektrometria. Použitím konfokálneho laserového skenovacieho mikroskopu bola skúmaná rýchlosť difúzie rozpustených látok cez steny kapilár, nasledovaná usporiadaním sieťovej štruktúry a izotropickou sieťou gélu. Transmisná elektrónová mikroskopia ukázala otvorenú agregovanú štruktúru v blízkosti kapilár. Použitím metódy FCS sa zistilo, že vrstva s najnižšou schopnosťou pohybu fluorescenčných častíc odpovedá anizotropnej vrstve, do ktorej je reťazec gélu usporiadaný. Kombinácia mikroskopických techník používaných pri tejto štúdii objasňuje tok i difúzne správanie, a to vizuálne, kvantitatívne aj kvalitatívne. Taktiež predstavuje sľubný nástroj pre budúce štúdie hromadného transportu v nerovnovážnych systémoch [74].

Rathgeber a spol. ukázali, že i metóda fluorescenčnej korelačnej spektroskopie s použitím komerčného spektroskopu môže byť ďalším nástrojom vhodným na meranie pasívnej mikroreológie vzoriek. Aby to dokázali, vytvorili experiment zameraný na porovnávanie výsledných dát, získaných použitím 5 rôznych metód. Konkrétne sa jedná o metódy: difúzna vlnová spektroskopia (DWS), dynamický rozptyl svetla (DLS), videomikroreológia, FCS mikroreológia a klasická reológia. Meranou vzorkou bol vysokomolekulárny vodný roztok polyethylenoxidu, tiež známeho ako polyethylenglykol. Výstupom experimentu bolo, že výsledky namerané štandardnými metódami boli zhodné s výsledkami získanými metódou FCS [75].

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

- Chemikálie: Agaróza, Sigma Aldrich, Co., for routine use, číslo šarže 9012-36-6
- Poly(sódium 4-styrénsulfonát), Sigma Aldrich, číslo šarže 25704-18-1
- Dextrán hydrochlorid, Sigma Aldrich, číslo šarže 9064-91-9
- L-lysin, Sigma Aldrich, číslo šarže 56-87-1
- Alginát sodný; SAFC, číslo šarže 9005-38-3
- Kyselina hyaluronová (1 400–1 600 kDa)
- Chitozán, Sigma Aldrich, číslo šarže 9012-76-4
- Hydroxid sodný pecky p.a., PENTA s.r.o., číslo šarže 1905160514
- Chlorid sodný, MERCI s.r.o., číslo šarže 7647-14-5
- Častice: Polystyrénové častice ; 0,1 µm; Sigma – Aldrich, číslo šarže 90517-5ML-F
- Polystyrénové častice; 0,5 µm; Sigma – Aldrich, číslo šarže 95585-5ML-F
- Polystyrénové častice; 1,0 µm; Sigma – Aldrich, číslo šarže 72938-10ML-F
- Modifikované fluorescenčné častice polystyrénu 30 nm Sigma – Aldrich, číslo šarže L5155-ML
- Modifikované fluorescenčné častice polystyrénu; 100 nm; Sigma – Aldrich, číslo šarže L9904-ML
- Rozpúšťadlo: Mili-Q voda (Milipore Academic)
- kyselina octová 99 %, p.a., Penta Chrudim

4.2 Prístroje a zariadenia

- ZetaSizer Nano ZS (Malvern)
- Reometer TA Instruments typu ARES
- analytické váhy Sealtex SBC 31
- varič ETA 2107
- prenosný teplomer GMM 175 Greisinger
- pH meter WTW pH 330
- magnetické miešačky Variomag Poly a Heidolph MR HEI-Standard

4.3 DLS mikrореолóгия

4.3.1 Príprava roztokov pre meranie zeta potenciálu a veľkosti častíc

Pred samotnou optimalizáciou DLS mikrореолóгия bolo nutné zistiť, či v študovaných agarózových géloch nebude dochádzať k agregácií medzi vkladnými mikrореологичесkými časticami, či už medzi sebou alebo s molekulami agarózy. Z týchto dôvodov musel byť najskôr zmeraný zeta potenciál a veľkosť častíc skúmaného materiálu.

Pre meranie zeta potenciálu a veľkosti častíc bol použitý prístroj ZetaSizer Nano ZS.

- Pri meraní zeta potenciálu bol nastavený merací modul Zeta – Potencial a použitá špeciálna dip cela. Táto cela udržiava vzorku medzi dvoma paládiovými elektródami a uskutočňuje sériu meraní zeta potenciálu. Pre sledovanie agregácie častíc, bol zvolený agarózový roztok o koncentracii 0,05 hm. % v objeme 10 ml. Táto hmotnostná koncentrácia agarózového gélu bola zvolená náhodne. Do pripraveného agarózového roztoku bolo následne pridaných 10 μ l polystyrénových častíc (PS) o veľkosti 500 nm. Používaná veľkosť a objem mikrореологичесkých častíc bola opäť zvolená náhodne. Takto pripravená vzorka bola za občasného miešania zahriata na teplotu 75 °C a prefiltrovaná cez 5,0 μ m filter do pripravených sklenených kyviet typu PCS 1 112 (12 mm *Glass Cell*), ktoré boli ihneď vložené do prístroja. Prístroj aj so sledovaným roztokom bol po dobu 10 minút kalibrovaný na teplotu 75 °C a potom bol zmeraný zeta potenciál pripravenej vzorky. Táto teplota bola zvolená z toho dôvodu, že bolo nutné rozpustiť čiastočky agarózy a zároveň nemohlo dôjsť ku gelácii meraného roztoku. Pre zistenie možnosti interakcií častíc musel byť zmeraný taktiež kontrolný roztok, pozostávajúca z 10 ml vody a 10 μ l polystyrénových častíc o veľkosti 500 nm. Meranie prebehlo vždy trikrát.
- Pre meranie veľkosti častíc bol použitý merací modul Size a sklenená kyveta. Postup prípravy agarózového roztoku a kontrolnej vzorky bol rovnaký ako pri meraní zeta potenciálu. Meranie oboch roztokov prebehlo trikrát.

4.3.2 Príprava vzoriek pre optimalizáciu DLS mikrореолóгия

Po zmeraní zeta potenciálu a veľkosti častíc agarózového roztoku sa mohlo pristúpiť k optimalizácii DLS mikrореолóгия. Optimalizovať túto metódu bolo potrebné z dôvodu výberu vhodnej hmotnostnej koncentrácie agarózového hydrogélu, do ktorého budú neskôr pridávané rôzne polyelektrolyty. Pre získanie plnohodnotných výsledkov bolo treba optimalizovať aj iné parametre, ktoré sa budú ďalej používať pri meraní mikrореолóгия agarózových roztokov.

Pre optimalizáciu DLS mikrореолóгия bola pripravená koncentračná rada agarózy obsahujúca 0,01%; 0,05%; 0,10%; 0,5%; 0,75% a 1,00% (hm. %) roztok o objeme 10 ml. K pripraveným roztokom bolo napipetovaných vždy iné množstvo mikrореологичесkých častíc. Vzorky boli za občasného miešania zahriate na 85 °C a prefiltrované pomocou mikrofiltrov o veľkosti pórov 5,0 μ m priamo do pripravených sklenených kyviet. Po dobu 45 minút bol roztok ponechaný k voľnému schladnutiu v laboratóriu na teplotu 25 °C. Pri zahrievaní a chladnutí agarózových systémov, boli roztoky vždy uzatvorené, aby nedochádzalo

k nežiadúcemu vyparovaniu rozpúšťadla a tak k zmene koncentrácie študovaných vzoriek. Každý roztok bol zmeraný trikrát.

4.3.2.1 Optimalizácia DLS mikrореológie

Pre úspešnú optimalizáciu bolo nutné voliť nasledujúce parametre:

- hmotnostná koncentrácií agarózového gélu (0,01 hm. %; 0,05 hm. %; 0,10 hm. %; 0,50 hm. %; 0,75 hm. % a 1,00 hm. %),
- typ a veľkosť častíc (0,1 μm PS častice; 0,5 μm PS častice; 1,0 μm PS častice; 30 nm fluorescenčné častice; 100 nm fluorescenčné častice)
- objem použitých mikrореologických častíc (10 μl ; 20 μl ; 40 μl)
- meranie v rôznych vzdialenostiach od prednej steny kyvety (napríklad 0,75 mm; 1,00 mm; 1,25 mm).

4.3.3 Nadstavenie prístroja pre meranie DLS mikrореológie

Pre meranie DLS mikrореológie bol použitý prístroj ZetaSizer Nano ZS a program ZetaSizer Software s meracím modulom Microrheology. Nadstavené parametre merania boli zvolené na základe optimalizácie nasledovne: Zvolenými časticami pre mikrореologické meranie boli častice polystyren latex 707 o veľkosti 100 nm. Teplota merania bola nadstavená na 25 °C a čas ekvilibračie na 120 sekúnd. Jedno meranie bolo opakované trikrát a odstup medzi jednotlivými meraniami bol nadstavený na 10 sekúnd. Pre zjednotenie výsledkov bola vždy nadstavená i fixná poloha merania, ktorá bola zvolená na 1 mm od steny kyvety.

4.4 Príprava agarózových hydrogélů s aktívnuou látkou

4.4.1 Príprava zásobných roztoků polyelektrolytů

Boli pripravené roztoky polyelektrolytů o koncentrácií 1,0 g·l⁻¹. Všetky použité polyelektrolyty sú zobrazené v tabuľke (Tabuľka 1). Pripravené roztoky boli ponechané po dobu 24 hodín na magnetickej miešačke, aby došlo k dokonalému rozpusteniu polyelektrolytu.

V prípade chitozánů bola navážka prevedená do odmernej banky a rozpustená v kyseline octovej o koncentrácií 5 hm. %. K dokonalému rozpusteniu polyméru, bol pripravovaný roztok ponechaný 24 hodín na magnetickej miešačke. Po rozpustení chitozánů bol roztok zneutralizovaný hydroxidom sodným o koncentrácií 5 mol·l⁻¹ na hodnotu pH 7. Neutralizácia roztoku bola sledovaná pomocou pH metru. Potom bol roztok doplnený vodou na potrebný objem.

Tabuľka 1: Používané polyelektrolyty.

biopolymér	náboj
L-lysin	kladný
Chitozán	
Poly(sódium 4-styrénsulfonát)	záporný
Alginát sodný	
Dextrán hydrochlorid	
Kyselina hyaluronová	

4.4.2 Príprava agarózového gélu s prídavkom polyelektrolytu

Na základe optimalizácie bola za najvhodnejšiu koncentráciu agarózového gélu (AG) zvolená koncentrácia 0,50 hm. %. Preto bolo do vialky navážených 0,05 g agarózy, ku ktorej bol napipetovaný odpovedajúci objem zásobného roztoku polyelektrolytu a vody tak, aby celkový získaný objem bol 10 ml (Tabuľka 2).

Tabuľka 2: Objem zásobného roztoku polyelektrolytu a vody pre vytvorenie roztoku o požadovanej hmotnostnej koncentrácii.

koncentrácia AG (hm. %)	obsah polyméru (hm. %)	zásobný roztok polyméru (ml)	voda (ml)
0,50	0,002	0,2	9,8
	0,005	0,5	9,5
	0,010	1,0	9,0

K pripraveným roztokom agarózy s prídavkom polyelektrolytu bolo na základe optimalizácie pridaných 40 μ l polystyrénových častíc o veľkosti 0,1 μ m. Roztoky boli za občasného premiešania zahriate na teplotu 85 °C, aby došlo k dokonalému rozpusteniu agarózy. Počas zahrievania roztokov boli vzorky uzavreté. Roztok s rozpustenou agarózou bol prefiltrovaný za pomoci mikrofiltru o veľkosti pórov 5,0 μ m priamo do sklenej kyvety a ponechaný za laboratórnej teploty po dobu 45 minút k voľnému schladnutiu. Kyvety boli počas chladnutia gélu opäť uzavreté. Po vychladnutí agarózového gélu s prídavkom polyelektrolytu na teplotu 25 °C, bola uzavretá kyveta daná do prístroja a bola zmeraná mikrореológia roztoku. Nastavenie parametrov pre meranie mikrореológie agarózových gélov s prídavkom polyelektrolytu je popísané v bode 4.3.3 Nastavenie prístroja pre meranie DLS mikrореológie. Každá vzorka bola zmeraná trikrát.

4.5 Príprava agarózových gélov pre sledovanie vplyvu iónovej sily

Vzhľadom k tomu, že mikrореologické vlastnosti môžu byť ovplyvňované aj zmenou iónovej sily roztoku, bola práve iónová sila ďalším parametrom, ktorý bol skúmaný v tejto diplomovej práci.

Pre sledovanie vplyvu iónovej sily v agarózovom géle s prídavkom polyelektrolytu, museli byť pripravené nové zásobné roztoky.

Najskôr bol pripravený roztok chloridu sodného o koncentracii $0,15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Potom bolo nutné pripraviť nový zásobný roztok polyelektrolytu o koncentracii $1,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, ktorý bol pripravený tak, že potrebné množstvo aktívnej látky bolo rozpustené v roztoku chloridu sodného. Za vhodný polyelektrolyt, ktorý bol použitý k skúmaniu vplyvu iónovej sily na agarózové roztoky bol zvolený poly(sódium 4-styrénsulfonát).

Na základe výsledkov merania museli byť pripravené i nasledujúce roztoky: roztok chloridu sodného o koncentracii $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a roztok PSS o koncentracii $1,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, ktorý bol rozpustený v roztoku chloridu sodného o koncentracii $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Po príprave vyššie spomínaných zásobných roztokov, mohli byť nachystané konečné vzorky pre meranie mikrereológie. Postup prípravy týchto roztokov je popísaný v bode 4.4.2 Príprava agarózového gélu s prídavkom polyelektrolytu.

4.6 Reológia

4.6.1 Príprava vzoriek pre meranie reológie

Pre porovnanie výsledkov získaných použitím DLS mikrereológie, bola zmeraná i klasická reológia sledovaných agarózových gélov. Pre meranie makrereológie roztokov boli na základe týchto mikrereologických výsledkov pripravené agarózové hydrogély o koncentracii 0,50 hm. % s prídavkom 0,002 hm. % polyelektrolytu (PSS, alginát, lysin). Postup prípravy roztokov bol rovnaký ako pre mikrereologické merania s tým rozdielom, že do roztokov neboli pridávané mikrereologické polystyrénové častice, pretože to táto metóda nevyžaduje.

4.6.2 Meranie reológie roztokov

Pomocou prístroju Reometer TA Instruments typu ARES boli vykonané dva druhy oscilačných testov na agarózových géloch. Konkrétne sa jedná o test amplitúdový deformačný a frekvenčný. Keďže študovaným materiálom boli 0,50 hm. % agarózové hydrogély, za vhodný senzor bola zvolená oceľová geometria typu doska/doska s priemerom 20 mm.

4.6.2.1 Amplitúdový test

Prvým testom, ktorému sa gély podrobili bol test deformačný. Pri tomto teste pracujeme s rovnakou frekvenciou oscilácie senzoru a menená je hodnota amplitúdy deformácie. Hlavnou úlohou tohto testu je nájsť hodnotu amplitúdy deformácie, pri ktorej začína dochádzať k nevratnému poškodeniu gélu. Výstupom amplitúdového testu je graf závislosti viskoelastických modulov na amplitúde deformácie, v ktorom je vyobrazená takzvaná lineárna viskoelastická oblasť (LVO). Z lineárnej viskoelastickej oblasti je následne zvolená vhodná hodnota amplitúdy deformácie pre nadväzujúci frekvenčný test. Nadstavenie amplitúdového testu je zobrazené v tabuľke (Tabuľka 3). Pred samotným testom bola vzorka, umiestnená medzi doskami reometru, ponechaná po dobu 3 minúty a pri teplote 25°C k odpočinku.

Tabuľka 3: Nastavené parametre pre amplitúdový test.

parametre	amplitúdový test
teplota (°C)	25
amplitúda deformácie (%)	0,01–1000
frekvencia oscilácie (Hz)	1
počet bodov v jednej dekáde	6

4.6.2.2 Frekvenčný test

Druhým oscilačným testom používaným pri meraní reológie agarózových gélov bol test frekvenčný. Pri tomto teste pracujeme s definovanou osciláciou senzoru, ktorá sa postupne mení od najvyššej hodnoty po najnižšiu. Hodnota amplitúdy deformácie je konštantná a bola získaná z lineárnej viskoelastickej oblasti v predošlom amplitúdovom teste. Hodnota LVO bola teda zvolená na 0,5 % pre všetky agarózové hydrogély s prídavkom polyelektrolytu. Pred vykonaním frekvenčného testu musela byť vzorka opäť ponechaná k odpočinku po dobu 3 minút a pri teplote 25 °C. Nastavenie frekvenčného testu je zobrazené v tabuľke (Tabuľka 4).

Tabuľka 4: Nastavené parametre pre frekvenčný test.

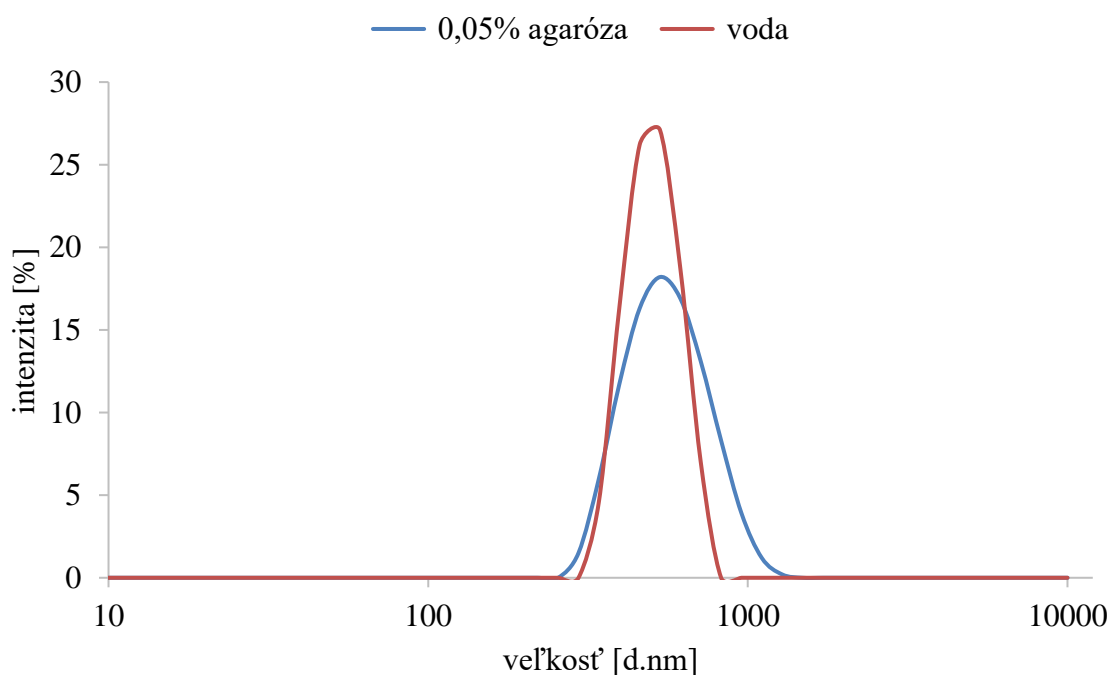
parametre	frekvenčný test
teplota (°C)	25
amplitúda deformácie (%)	0,5
frekvencia oscilácie (Hz)	0,01–100
počet bodov v jednej dekáde	6

5 MERANIE A VYHODNOTENIE DAT

5.1 Zeta potenciál a veľkosť častíc

Pred samotným meraním mikrореológie roztokov, musel byť najskôr zmeraný zeta potenciál a veľkosť častíc pripravených vzoriek. Meranie zeta potenciálu a veľkosti častíc prebehlo z dôvodu vylúčenia agregácie vložených mikrореologických častíc, či už medzi sebou alebo s molekulami agarózy. Výsledkom týchto meraní je graf, ukazujúci závislosť intenzity na nameranej veľkosti prítomných častíc a hodnoty zeta potenciálu pre oba sledované roztoky.

Na grafe (Obrázok 18) teda môžeme vidieť, že pík získaný meraním veľkosti častíc vo vode, dosahuje najvyššej intenzity pri veľkosti častíc približne v hodnote 500 nm. Na základe získaných výsledkov pre 0,05 hm. % agarózový roztok, môžeme tvrdiť, že najvyššej intenzity dosahujú častice v okolí hodnoty 500 nm. Pri vzájomnom porovnaní získaných píkov pre vodu a agarózový roztok si ďalej môžeme všimnúť, že namerané hodnoty veľkosti častíc pre agarózový roztok sú posunuté k vyšším hodnotám veľkosti a zároveň došlo i k poklesu intenzity. Môže to byť zapríčinené tým, že tento roztok už neobsahoval len rozptýlené polystyrénové častice, ale aj rozpustené molekuly agarózy, ktoré sa už i pri nižšej teplote mohli zoskupovať a vytvárať tak sieťovú štruktúru. Na základe nameraných veľkosti častíc pre vzorku vody a agarózový roztok, môžeme tvrdiť, že nedochádza k vzájomnej agregácii PS častíc a ani k agregácii týchto častíc s molekulami agarózy, pretože nameraná veľkosť častíc v oboch prípadoch sa približne rovná rozmeru vkladanych mikrореologických častíc.



Obrázok 18: Graf závislosti intenzity na veľkosti častíc.

V tabuľke (Tabuľka 5) môžeme vidieť namerané zeta potenciály pre sledovanú vzorku vody a agarózový roztok. Pokiaľ sú tieto hodnoty väčšie ako 30 mV, znamená to, že všetky sledované molekuly majú dostatočne veľký náboj na to, aby sa odpudzovali a tak nedochádza k ich vzájomnej agregácii. Namerané hodnoty zeta potenciálu vo vzorke vody obsahujúcej polystyrénové častice sú väčšie ako táto hodnota a preto je tento roztok stabilný. Výsledné hodnoty zeta potenciálu pre agarózový roztok sú však o čosi menšie. Stále však môžeme tvrdiť, že sa nachádzajú na hranici stability, a preto by ani v týchto roztokoch nemalo dochádzať k zhlukovaniu častíc.

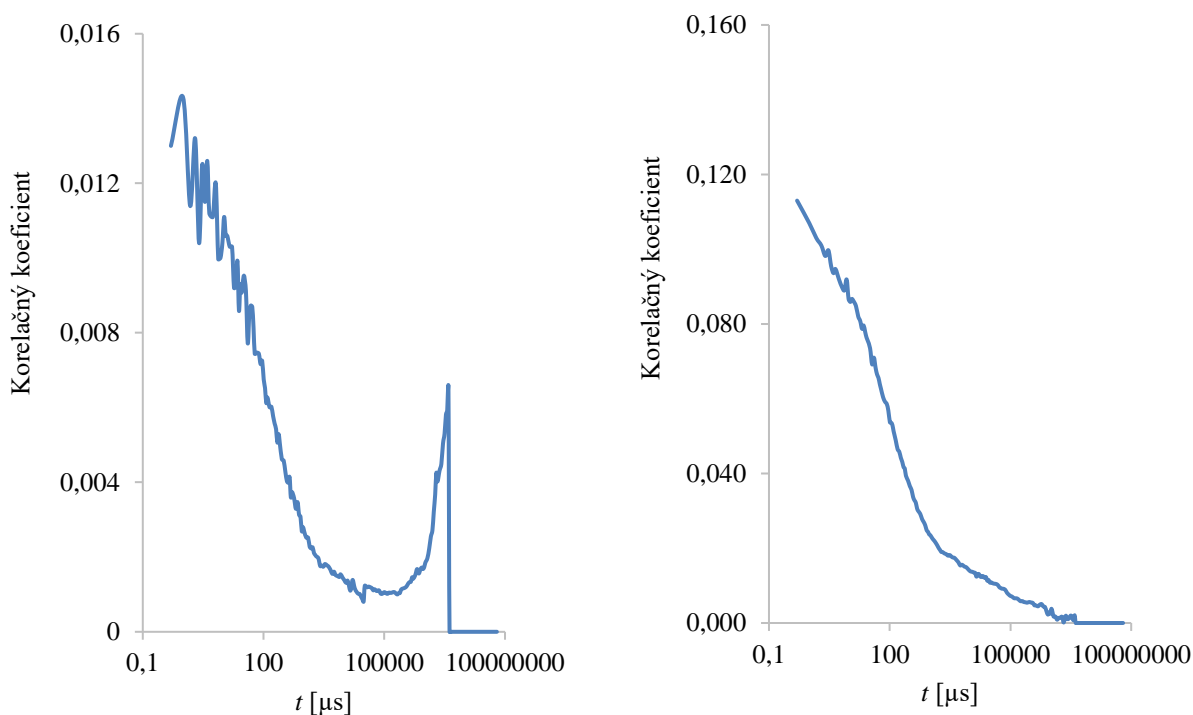
Tabuľka 5: Hodnoty nameraných zeta potenciálov pre študované materiály. Všetky hodnoty sú uvedené v absolútnej hodnote.

opakovanie	Zeta potenciál (mV)	
	voda	agarózový roztok
1.	31,6	27,6
2.	33,5	26,2
3.	33,7	26,6

5.2 Optimalizácia DLS mikrореológie

5.2.1 Objem mikrореologických častíc

Pred meraním agarózových gélov s prídavkom polyelektrolytov je nutné zvoliť vhodný objem vkladáných mikrореologických častíc. Je potrebné, aby množstvo častíc bolo dostatočne malé na to, aby sme zamedzili vzájomnej interakcii častíc a zároveň dostatočne veľký na to, aby dochádzalo k rozptylu svetla. Je nutné aby k rozptylu svetla dochádzalo na vložených časticách pohybujúcich sa Brownovým pohybom a nie na molekulách matrice, čo by spôsobovalo skreslenie výsledkov. Pri nižších koncentráciách agarózy – 0,01 hm. % a 0,05 hm. %, postačí používať menšie množstvo mikrореologických častíc o objeme 20 μ l, pretože vzorka má nízku viskozitu a častice sa preto môžu pohybovať s vyššou energiou. Pri zvyšných koncentráciách agarózy je nutné použiť väčší objem častíc, pretože v roztoku prevláda elastická zložka nad viskóznou a častice sa ťažšie pohybujú v skúmanom roztoku. Pre ďalšie skúmanie agarózových roztokov s prídavkom polymérov bol zvolený objem o veľkosti 40 μ l.

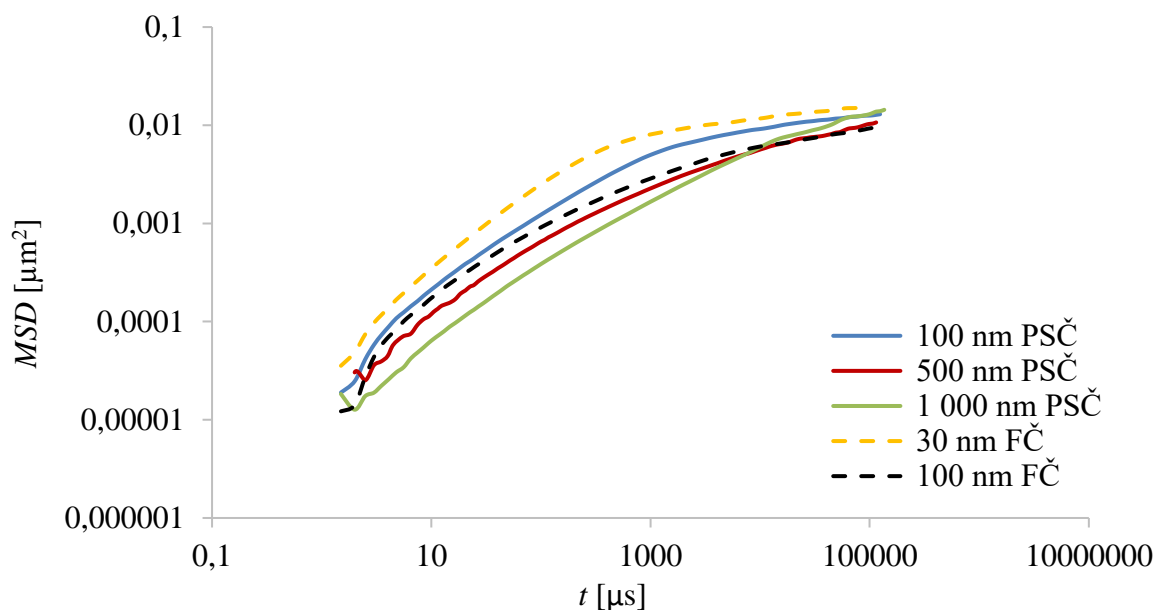


Obrázok 19: Ukážka nameraných korelačných priamok pre 0,50 hm. % agarózový roztok s prídavkom 10 μ l (vľavo) a 40 μ l (vpravo) polystyrénových častíc o veľkosti 500 nm.

5.2.2 Veľkosť mikrореologických častíc

V ďalšom experimente bolo zisťované aký majú častice o rôznej veľkosti, druhu a náboja vplyv na reologické vlastnosti skúmaného materiálu. Zvolené častice sa náhodne pohybujú v sledovanej vzorke, pri čom narážajú do okolitých agarózových reťazcov. Z dráhy, ktoré tieto častice urazia sú stanovené mikrореologické vlastnosti prostredia, v ktorom sa pohyb uskutočňuje. Malé častice majú schopnosť pohybovať sa v póroch pozorovaného materiálu. Z takýchto malých častíc boli v experimente použité fluorescenčné častice o veľkosti 30 nm. Zo závislosti hodnôt MSD na čase sa zistilo, že i takto malé častice sa stretávajú s odporom prostredia, v ktorom voľne difundujú. Mikrореologické častice väčších rozmerov, ako sú 500 nm polystyrénové častice a 1 000 nm polystyrénové častice nie je vhodné používať v našom experimente, pretože tieto častice sa pohybujú pomaly a vykazujú veľký odpor prostredia.

Ďalej boli použité 100 nm fluorescenčné častice s nábojom, ktoré sú inertné voči molekulám vodného roztoku agarózy. Tieto častice by mohli byť vhodné pre ďalšie experimenty, ale keďže táto metóda nevyžaduje schopnosť častíc fluoreskovať, nebudú naďalej používané. Za vhodnú veľkosť mikrореologických častíc, s ktorými budú vykonávané nasledovné experimenty boli na základe nižšie uvedeného grafu zvolené 100 nm polystyrénové častice (Obrázok 20).



Obrázok 20: Graf závislosti MSD na čase pre 0,10 hm. % agarózový roztok. Použité boli fluorescenčné častice (FČ) a polystyrénové častice (PSČ) o rôznej veľkosti

Na grafe závislosti MSD na čase (Obrázok 20) môžeme vidieť, že čím menšie mikrореologické častice boli počas optimalizácie DLS mikrореológie použité, tým intenzívnejší pohyb vykazovali. Najrýchlejšie sa teda pohybovali 30 nm fluorescenčné častice a naopak najpomalšie sa pohybovali 1 000 nm polystyrénové častice, ktoré zároveň vykazujú najväčší odpor prostredia. Ďalej môžeme vidieť, že podobnú aktivitu ako majú 100 nm polystyrénové častice majú aj 100 nm častice fluorescenčné. Mierna odchýlka medzi ich nameranými MSD priamkami môže byť spôsobená materiálom, z ktorého sú častice vyrobené, ale taktiež ich rozdielnym nábojom. Polystyrénové častice majú totiž záporný náboj a fluorescenčné častice sú nabité kladne.

5.2.3 Poloha merania

Polohu merania je dôležité optimalizovať nie len z dôvodu zjednotenia výsledkov, ale aj preto, že je nutné minimalizovať viacnásobný rozptyl svetla, ktorý by skresľoval mikrореologické výsledky. Na základe získaného tvaru korelačnej priamky bola za vhodnú polohu merania zvolená poloha 1 mm od steny kvety.

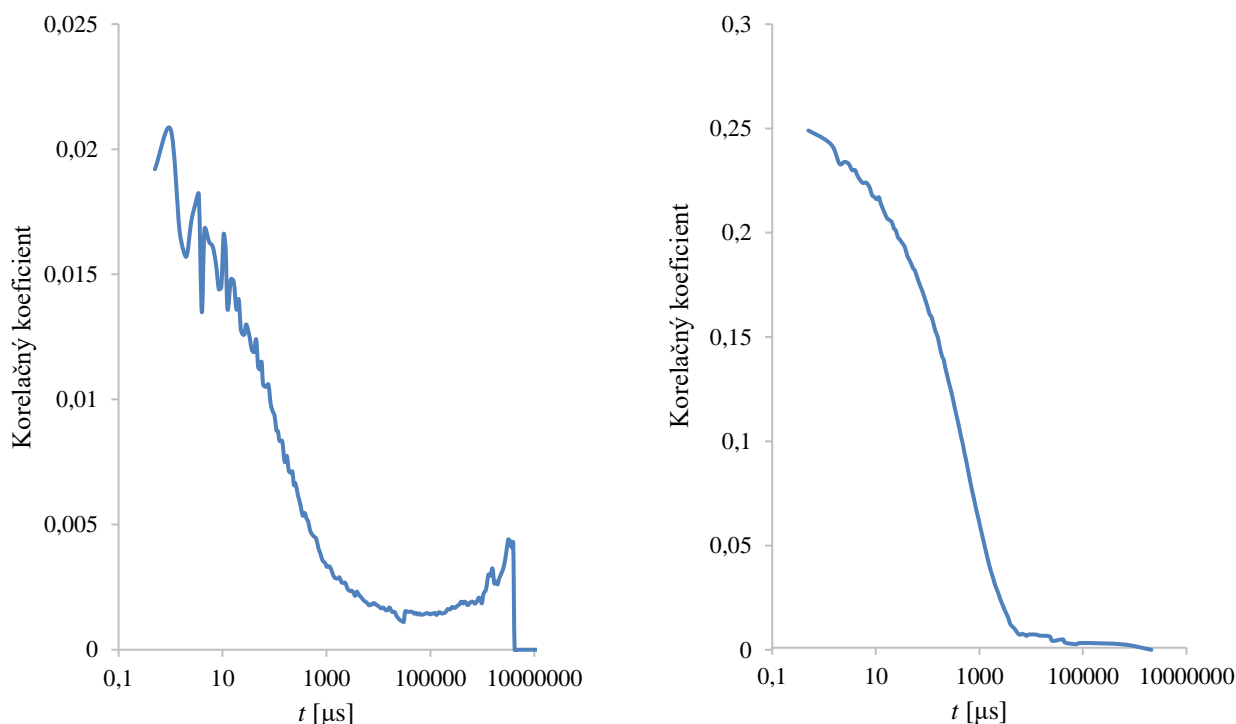
5.2.4 Sumarizácia optimalizácie DLS mikrореológie

Počas optimalizácie metódy mikrореológie dynamického rozptylu svetla, boli skúmané mnohé parametre, ktoré by mohli byť použité k štúdiu mikrореologických vlastností agarózových gélov. Hovoríme o parametroch ako sú objem vkladných mikrореologických častíc, druh a veľkosť týchto častíc, ale taktiež poloha, v ktorej sa bude uskutočňovať samotné meranie. Na základe všetkých optimalizácií, boli vybrané najvhodnejšie parametre, ktoré budú použité v nasledujúcich experimentoch (Tabuľka 6)

Tabuľka 6: Sumarizácia optimalizovaných parametrov.

objem častíc (μl)	veľkosť častíc (nm)	poloha merania (mm)
40	100	1,00

Na základe vyššie spomínaných experimentov bola z meraní odstránená nie len časť šumu, ale zároveň bola získaná i pekná korelačná priamka (Obrázok 21)

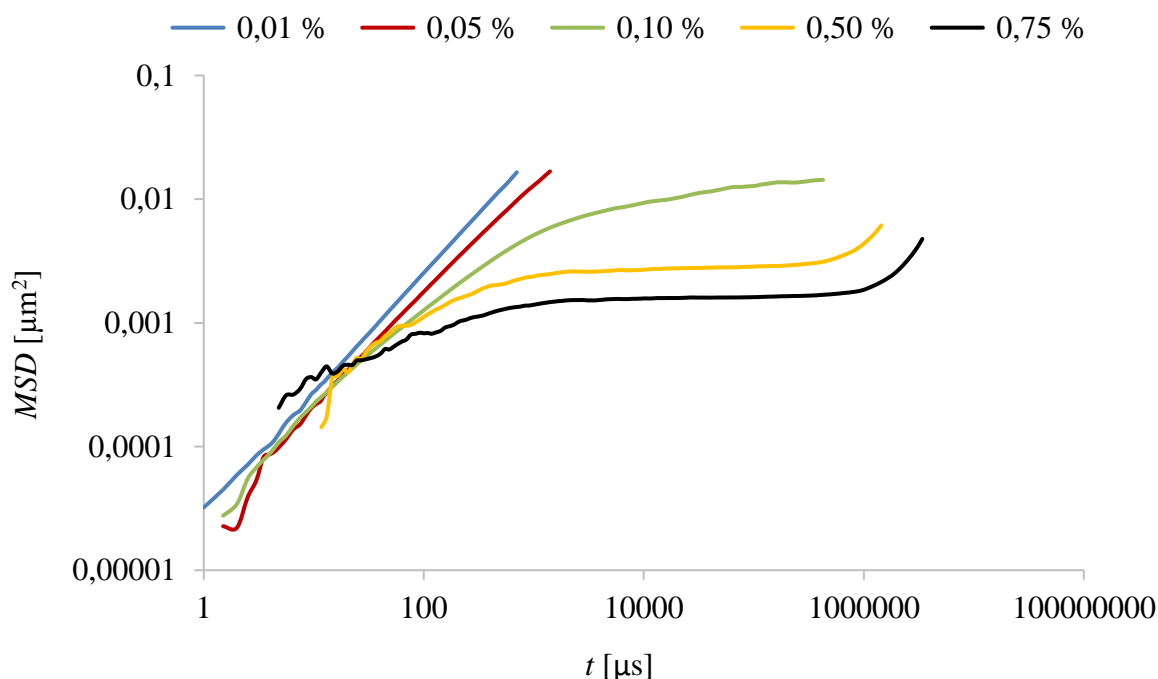


Obrázok 21: Ukážka korelačnej priamky pred optimalizáciou metódy pre 0,50 hm. % agarózový roztok (vľavo). Korelačná priamka po optimalizácii DLS mikrereológie pre 0,50 hm. % agarózový roztok (vpravo).

5.2.5 Výber vhodnej koncentrácie agarózových gélov

K optimalizácii DLS mikrereológie bola použitá koncentračná rada agarózových roztokov s fixným objemom a veľkosťou mikrereologických častíc. Po ich vizuálnej analýze sa zistilo, že agarózové roztoky obsahujúce nízku navážku agarózy, konkrétne 0,01 hm. % a 0,05 hm. % agarózový roztok, nie sú vhodné pre nasledovné meranie. Dôvodom je, že vo vzorkách viditeľne prevláda kvapalná fáza a roztok teda nevytvára súvislý gélový systém. Tento fakt potvrdzujú aj MSD priamky, ktoré majú lineárny charakter, z čoho vyplýva, že sa jedná o čisto viskózne médium. Tieto gély boli z ďalších štúdií vylúčené i z toho dôvodu, že v predošlých prácach, ktoré boli na podobnú tematiku, boli študované agarózové roztoky predovšetkým o vyšších koncentráciách agarózy (0,50 – 1,00 hm. %). U 0,10 hm. % agarózového roztoku už môžeme pozorovať výraznejší nárast elastickej zložky materiálu, stále však vzorka nevytvára súvislý gélový systém, ale nadobúda charakter sólu. Prítomnosť elastickej zložky dokazujú i namerané hodnoty MSD, ktoré už netvoria priamku, ale so zvyšujúcim sa časom sa vytvára zakrivenie. Pre analýzu agarózových roztokov s prídavkom polyelektrolytov sú vhodné gély

o koncentráciách 0,50 hm. %; 0,75 hm. % a 1,00 hm. %, ktoré obsahujú väčšie množstvo agarózy a preto výrazne vzrastá ich elasticita a MSD priamka nadobúda viskoelastický charakter (Obrázok 22).



Obrázok 22: Graf závislosti MSD na čase pre rôzne koncentrácie agarózových gélov. Pre meranie boli použité mikrореologické častice o veľkosti 0,1 μm .

Na grafe závislosti MSD na čase (Obrázok 22) si teda môžeme všimnúť, že MSD priamky pre roztoky s nižšou koncentráciou agarózy, napríklad 0,01 hm. % majú lineárny charakter. Znamená to, že vložené mikrореologické častice sa môžu počas celej doby merania pohybovať spontánnym Brownovým pohybom. MSD priamka pre vyššie koncentrácie agarózových gélov ako je napríklad MSD priamka pre 0,75 hm. % gél má tri oblasti a priamka teda nadobudla viskoelastický tvar. Jedná sa o dva nárasty MSD priamky a jednu lineárnu časť. Prvý nárast MSD priamky znamená, že častice sa môžu v skúšanom roztoku voľne pohybovať. Jedná sa o pohyb častíc v rozpúšťadle, ktoré bolo pri príprave vzorky použité. MSD priamka v určitom bode začína prechádzať do lineárnej oblasti, ktorá je rovnobežná s osou x . Vytvorenie tejto lineárnej oblasti je zapríčinené tým, že pohyb mikrореologických častíc v roztoku je čiastočne blokovaný vzniknutými agarózovými reťazcami. Začína sa teda prejavovať elasticita materiálu. Po čase vykazujú sledované častice opäť voľný pohyb, na základe ktorého môžeme určiť makroskopickú viskozitu sledovaného agarózového gélu.

Z viskoelastického tvaru MSD priamok sa dá vyčítať i zmena elastických modulov. Porovnaním tvarov MSD priamok pre 0,50 hm. % a 0,75 hm. % agarózový systém môžeme tvrdiť, že pri vytvorení 0,75 hm. % gélu došlo k zvýšeniu elasticity materiálu v dôsledku ťahovania vzniknutej agarózovej siete. Môžeme teda usúdiť, že čím väčší odklon vykazujú namerané MSD hodnoty od osy y , tým viac gélovej siete je vytvorenej v pozorovanom systéme.

Keďže sa v praxi najviac využívajú 1,00 hm. % agarózové gély, javí sa práve táto koncentrácia ako vhodný roztok pre nastávajúce štúdium transportných procesov v hydrogélach. Pri meraní

takto koncentrovaného vzorku sa pri vychladnutí roztoku vytvorí veľké množstvo pevnej gélovej siete, ktorá „zajme“ vložené častice do svojej štruktúry. Zvýšením koncentrácie agarózy v roztoku sa odpor prostredia, v ktorom sa pohybujú mikrореologické častice, zvyšuje natoľko, že vložené častice strácajú schopnosť spontánneho pohybu. Uväznenie častíc v gélovej sieti a vysoká hustota agarózovej siete znemožnila zanalyzovať 1,00 hm. % agarózový roztok použitím metódy DLS mikrореológie.

Vizuálnym pozorovaním pripravených agarózových gélov sa 0,75 hm. % roztok svojimi vlastnosťami a rýchlosťou vytvorenia gélovej štruktúry najviac podobal 1,00 hm. % agarózovému roztoku. Ani chovanie tohto roztoku preto nebolo možné za daných podmienok preskúmať.

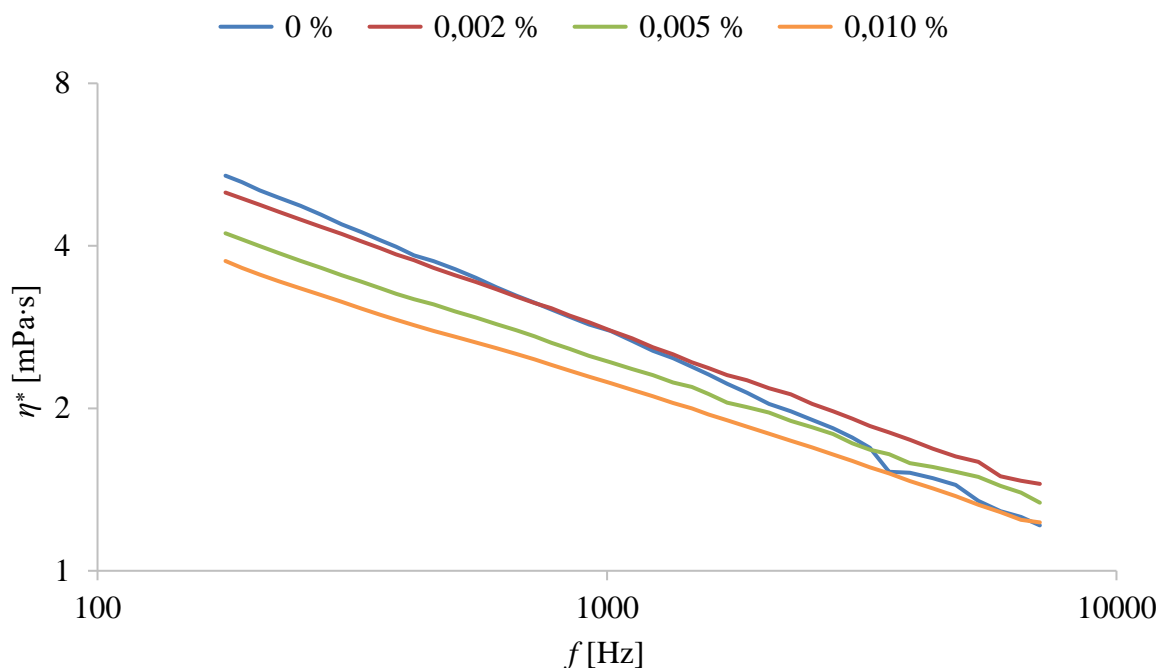
Z týchto dôvodov bol práve 0,50 hm. % agarózový gél zvolený ako vhodná matrica k budúcemu štúdiu transportných vlastností agarózových hydrogélů s prídavkom polyelektrolýtov.

5.3 Mikrореologická charakterizácia hydrogélů

5.3.1 Prídavok rôzneho objemu polyelektrolýtu

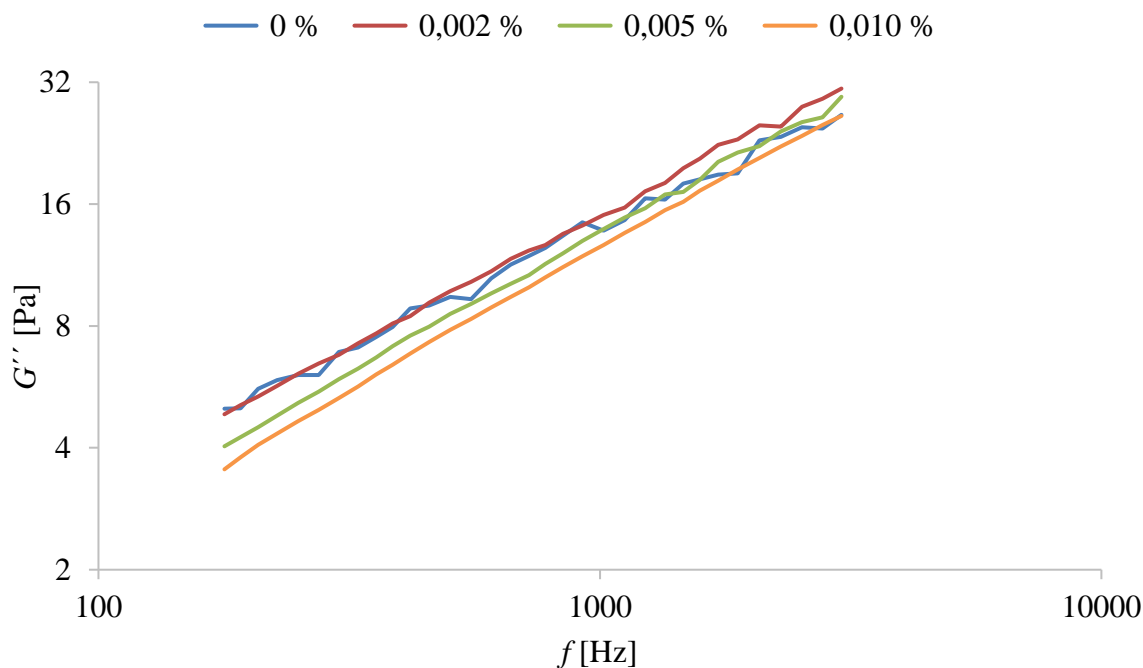
Po optimalizácii parametrov a výberu vhodnej koncentrácie agarózového gélu sa mohlo pristúpiť k prvému experimentu. Použitím metódy mikrореológie dynamického rozptylu svetla boli stanovené mikrореologické vlastnosti agarózových hydrogélů s prídavkom polyelektrolýtov. Jeden z hlavných cieľov tohto experimentu bolo zistiť, aký vplyv má pridanie rôzneho množstva používaného polyelektrolýtu na výsledné reologické vlastnosti skúmaných gélových systémů. Zmena viskoelastických vlastností by bola príčinou zmeny transportných procesů v hydrogélůch. K experimentu boli vytvorené 4 rôzne gélové systémy, a to konkrétne systémy obsahujúce 0 hm. %; 0,002 hm. %; 0,005 hm. % a 0,010 hm. % polyelektrolýtu poly(sódium 4-styrénsulfonátu). Analýzou pripravených roztoků boli stanovené veličiny ako komplexná viskozita, viskoelastické moduly a hodnoty MSD všetkých skúmaných vzoriek.

Na grafe závislosti komplexnej viskozity na frekvenciách (Obrázok 23), môžeme sledovať klesanie hodnôt komplexnej viskozity s rastúcim prídavkom polyelektrolýtu v agarózovom hydrogéle. Pre gély obsahujúce prídavok 0 hm. % a 0,002 hm. % poly(sódium 4-styrénsulfonátu) môžeme tvrdiť, že tvorba gélového systému prebieha veľmi podobným spôsobom a že prídavok takéhoto malého množstva polyelektrolýtu do sledovaného systému nemá moc veľký vplyv na výsledné viskoelastické vlastnosti. Väčšiu zmenu mikrореologických vlastností môžeme pozorovať v gélových systémoch s prídavkom 0,005 hm. % a 0,010 hm. % PSS. Na grafe teda môžeme vidieť, že 0,010 hm. % agarózový roztok vykazuje najnižšiu viskozitu. Na základe týchto výsledkov môžeme tvrdiť, že roztoky s väčším prídavkom aktívnej látky majú nižšiu viskozitu.



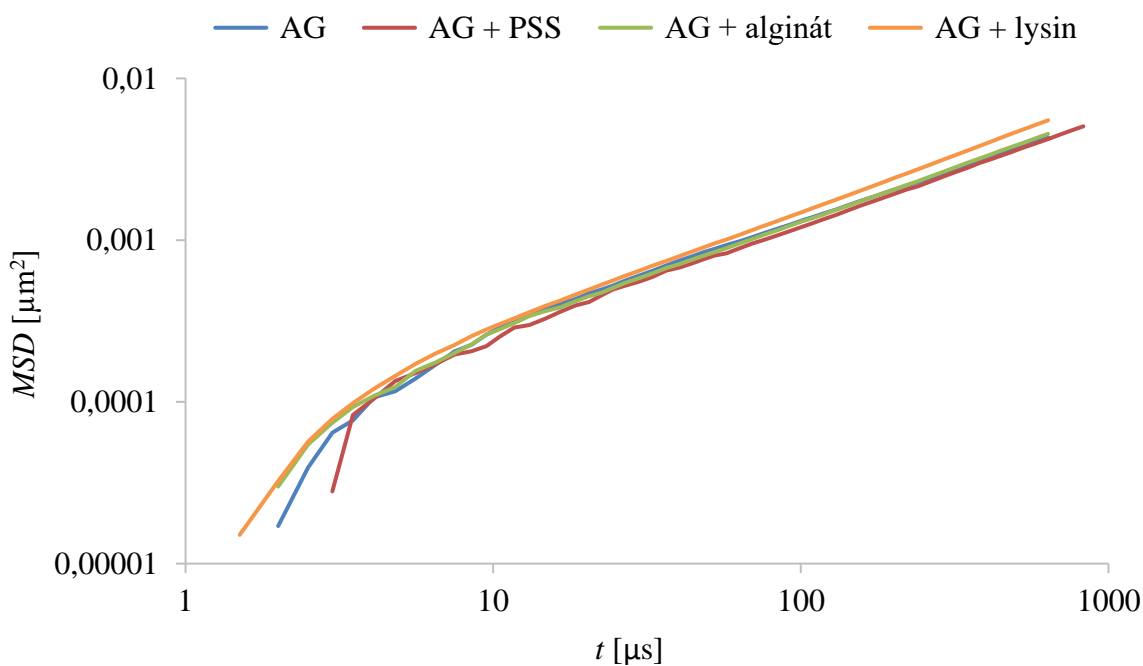
Obrázok 23: Graf závislosti komplexnej viskozity na frekvencii pre 0,50 hm. % agarózový roztok obsahujúci rôzny objem pridávaného polyelektrolytu. Obe osy sú zobrazené v logaritmickom meradle.

Na grafe závislosti stratového modulu na frekvencii (Obrázok 24) si môžeme všimnúť, že namerané hodnoty viskózneho modulu pre 0 hm. % a 0,002 hm. % systémy majú približne rovnaké hodnoty. Znamená to, že prídavok polyelektrolytu o veľkosti 0,002 hm. % nemá výrazný vplyv na zmenu stratovej zložky v skúmanom hydrogéle. Nižšími hodnotami viskózneho modulu sa vyznačuje systém s prídavkom 0,005 hm. % PSS. Tento agarózový gél preto vykazuje nižšiu viskozitu v porovnaní s agarózovým systémom bez prídavku polyelektrolytu. Najbadateľnejšiu zmenu viskoelastických vlastností opäť nadobúda roztok s prídavkom 0,010 hm. % PSS. Jeho stratová zložka je najnižšia, a preto má najnižšiu viskozitu.



Obrázok 24: Graf závislosti viskózneho modulu na frekvencii pre 0,50 hm.% agarózový roztok obsahujúci rôzny objem pridávaného polyelektrolytu. Obe osy sú v logaritmickom meradle.

Z grafu závislosti MSD na čase (Obrázok 25) môžeme na základe tvaru MSD kriviek vyčítať, že najnižšiu elasticitu a teda najnižšiu viskozitu zo všetkých štyroch skúmaných roztokov má roztok obsahujúci prídavok 0,010 hm. % PSS. Rozdiely medzi nameranými hodnotami MSD sú však nepatrné. Naopak najelastickéjšie sú agarózové systémy s 0 hm. % a 0,002 hm. % prídavkom polyelektrolytu.



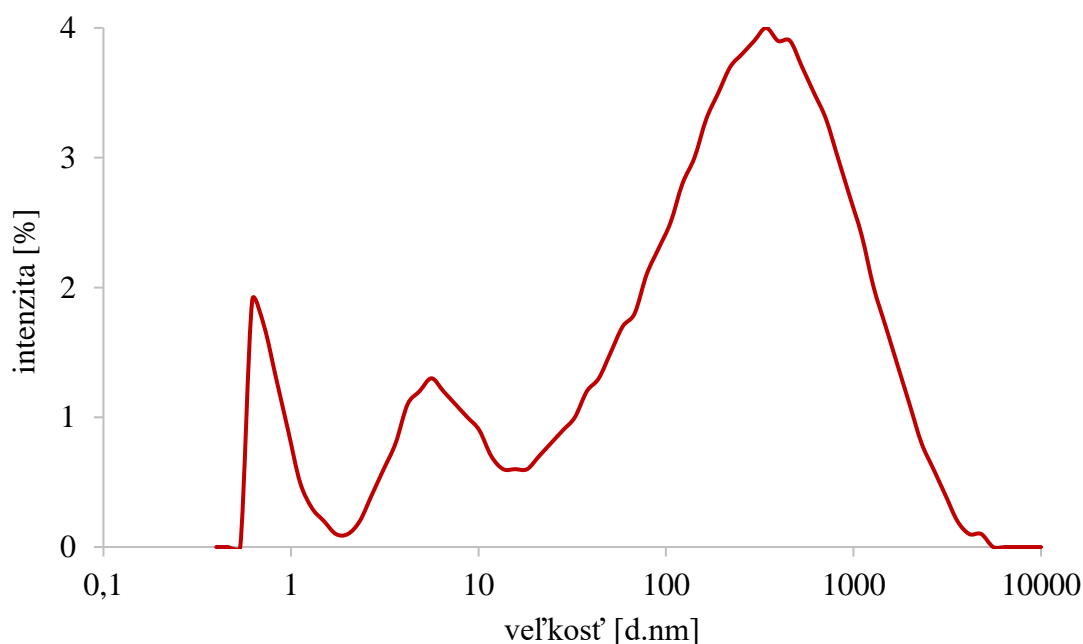
Obrázok 25: Graf závislosti MSD na čase pre 0,50 hm. % agarózový roztok obsahujúci rôzny objem pridávaného polyelektrolytu.

Na základe týchto výsledkov môžeme tvrdiť, že čím menšie množstvo polyelektrolytu sa v skúmanom systéme nachádza, tým elastickejšie chovanie roztok vykazuje. Tento fakt môže byť spôsobený tým, že čím viac polyelektrolytu pridáme do agarózového systému, tým viac záporného náboja sa v tomto roztoku nachádza. Molekuly PSS, ktoré sú súčasťou agarózových reťazcov majú tak väčšiu tendenciu k odpudzovaniu sa, čo spôsobuje menšiu pevnosť vzniknutej gélovej štruktúry a teda klesanie viskozity skúmaného agarózového hydrogél.

5.3.2 Prídavok rozličného polyelektrolytu

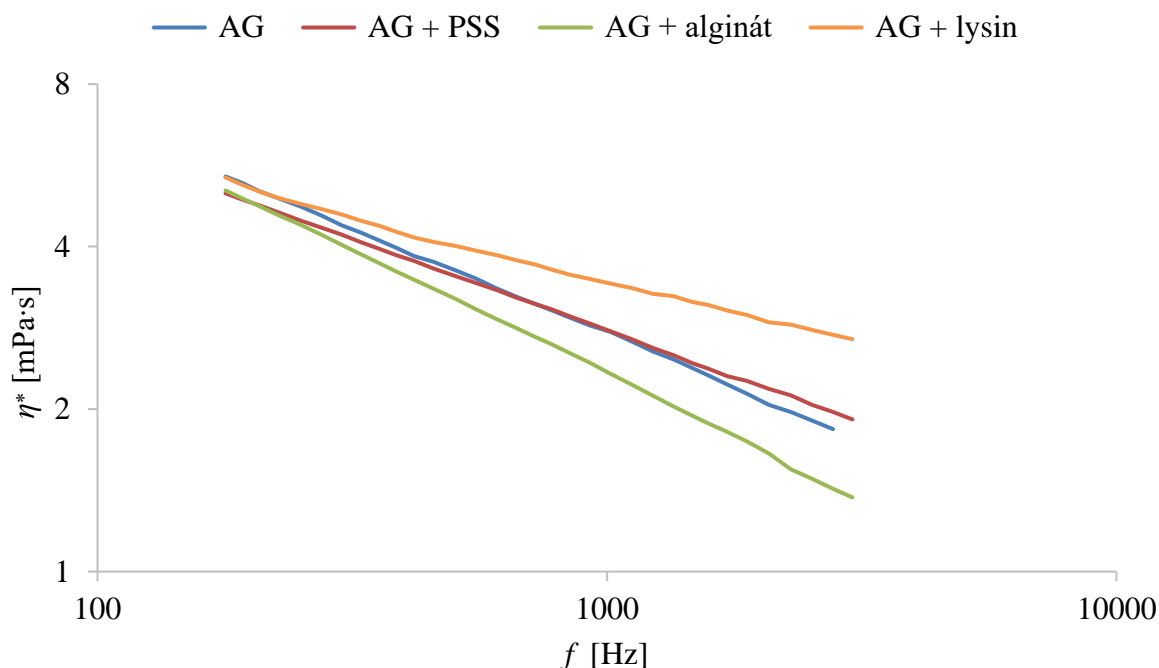
Ďalším cieľom tohto experimentu je zistiť, aký vplyv má pridanie rôzne nabitých polyelektrolytov do agarózovej matrice na jej výsledné mikrореologické vlastnosti. Zo záporne nabitých polyelektrolytov boli používané poly(sódium 4-styrénsulfonát), alginát sodný, kyselina hyaluronová a dextrán hydrochlorid, z kladne nabitých boli vybrané *L*-lysin, a chitozán. Pre ilustráciu vplyvu prídavku polyelektrolytu na výsledné viskoelastické vlastnosti agarózového systému boli zvolené roztoky s prídavkom 0,002 hm. % polyelektrolytu.

Roztoky s prídavkom troch vybraných aktívnych látok sa však nepodarilo zmerať, a práve preto bola zameraná i veľkosť častíc týchto roztokov. Konkrétne sa jedná o vzorky s prídavkom dextránu, chitozánu a kyseliny hyalurónovej. V prípade dextránu a kyseliny hyalurónovej sa ukázalo, že najväčšiu intenzitu vykazujú častice o veľkosti v rozmedzí približne 100 až 10 000 nm, čo je viac, ako bola veľkosť nami vložených mikrореologických častíc (Obrázok 26). Veľká priestorová štruktúra týchto polyelektrolytov tak zapríčinila, že spomínané roztoky nemohli byť preskúmané pomocou metódy mikrореológie dynamického rozptylu svetla. V prípade chitozánu sa nepodarilo za daných podmienok dosiahnuť pekný tvar korelačnej priamky. Predpokladá sa, že prídavok kladne nabitého chitozánu do agarózového roztoku zmenil jeho mechanické vlastnosti tým, že podporil tuhosť agarózových reťazcov čím obmedzil spontánny pohyb sledovaných mikrореologických častíc.



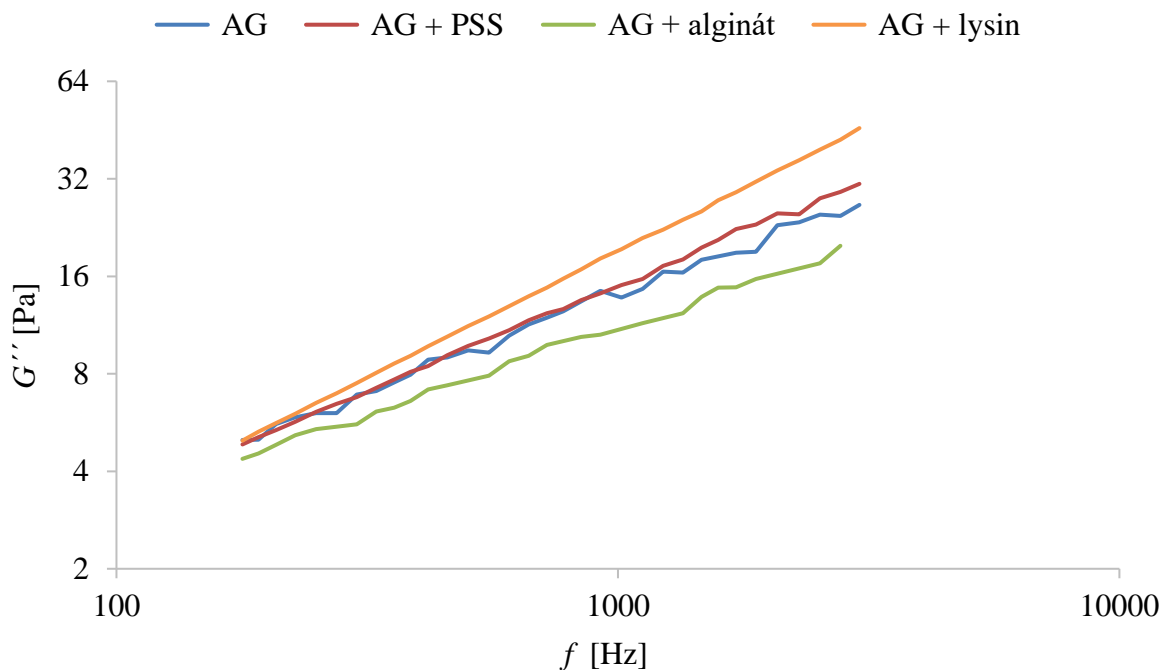
Obrázok 26: Ukážka grafu závislosti veľkosti častíc na intenzite pre 0,50 hm. % agarózový roztok obsahujúci prídavok 0,002 hm. % dextránu.

Na grafe závislosti komplexnej viskozity na frekvencii (Obrázok 27) je vidieť, že najväčší vplyv na viskoelastické vlastnosti agarózového gélu má prídavok kladne nabitého polyelektrolytu lysinu. Čím sa mikoreologické častice pohybujú vo vyšších uhlových frekvenciách, tým väčší rozdiel je pozorovaný medzi komplexnou viskozitou lysinu a čistého agarózového gélu. Prídavok lysinu najviac zvyšuje viskozitu roztoku zo všetkých použitých polyelektrolytov. Zo záporne nabitých polymérov vykazuje najväčšiu zmenu mikoreologických vlastností prídavok alginátu, ktorý oproti lysinu znižuje elasticitu sledovaného roztoku. Tento roztok sa tak stáva roztokom s najmenšou viskozitou. Najmenšia zmena vlastností, nastáva pri prídavku PSS do agarózového hydrogél.



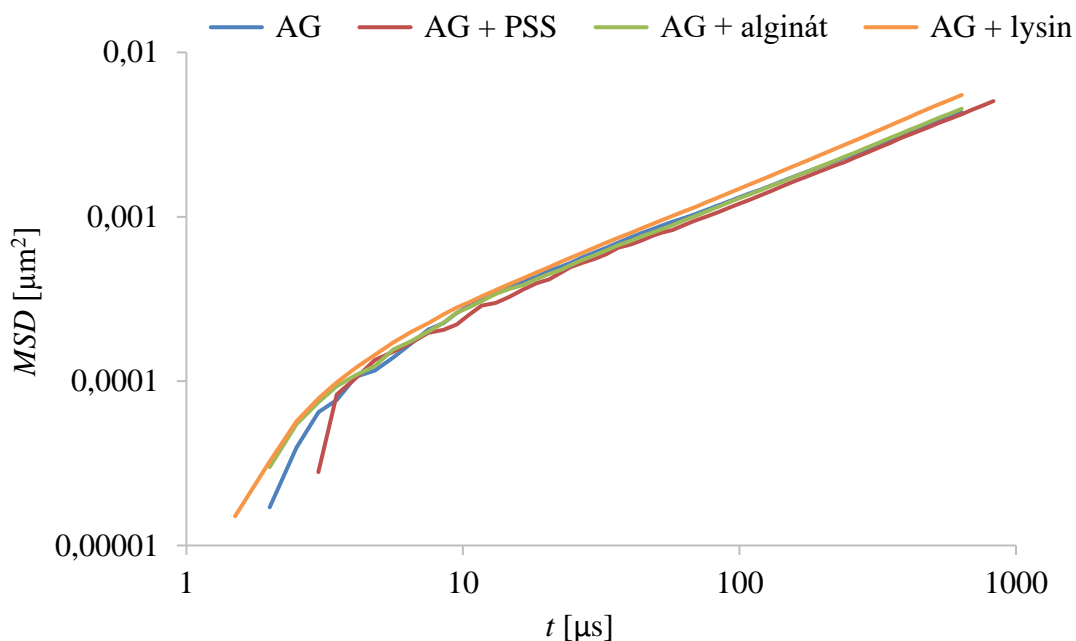
Obrázok 27: Graf závislosti komplexnej viskozity na frekvencii pre 0,50 hm. % agarózový roztok s prídavkom vždy 0,002 hm. % rôzneho polyelektrolytu. Obe osy sú zobrazené v logaritmickom meradle.

Z grafu závislosti viskózneho modulu na frekvencii (Obrázok 28) je patrné, že prídavkom alginátu do agarózového systému znížime jeho stratovú zložku, takže znížime viskozitu roztoku. Naopak zvýšenie viskózneho modulu, a teda i zvýšenie viskozity dosiahneme prídavkom aminokyseliny lysinu. Najmenší vplyv na výsledné mikoreologické vlastnosti má opäť prídavok PSS. Pri vzájomnom porovnaní vzoriek obsahujúcich kladne nabitý lysin so vzorkami obsahujúcimi vo svojej štruktúre záporne nabitý polyelektrolyt môžeme tvrdiť, že vzorka obsahujúca kladne nabitú aminokyselinu nám pri vyšších uhlových frekvenciách ako jediná zvyšuje viskózný modul študovaných agarózových gélov.



Obrázok 28: Graf závislosti viskózneho modulu na frekvencií pre 0,50 hm. % agarózový roztok s prídavkom vždy 0,002 hm. % rôzneho polyelektrolytu. Obe osy sú v logaritmickom meradle

Na grafe závislosti MSD na čase (Obrázok 29) si môžeme všimnúť, že systém s najnižšou elasticitou je opäť agarózový gél s prídavkom lysinu, ktorého MSD priamka je od osy x najďalej. Najelastickjší charakter zase vykazuje agarózový gél s prídavkom PSS. Rozdiely medzi jednotlivými MSD krivkami sú však veľmi malé.



Obrázok 29: Graf závislosti MSD na čase pre 0,50 hm. % agarózový roztok s prídavkom vždy 0,002 hm. % rôzneho polyelektrolytu.

Pokles viskozity skúmaného materiálu vykazujú teda roztoky obsahujúce záporne nabité polyelektrolyty. Najväčší pokles viskozity je pozorovaný v agarózovom hydrogéle s prídavkom alginátu. O niečo nižší pokles je patrný v roztokoch obsahujúcich prídavok PSS. Tento rôzny pokles viskozít gélov môže byť spôsobený tým, že molekula alginátu, ktorá obsahuje dve podjednotky, má po svojej disociácii v roztoku väčšiu hustotu vzniknutého záporného náboja v porovnaní s molekulou PSS. Väčší obsah záporného náboja v skúmanom materiáli opäť značí väčší pokles viskozity, pretože dochádza k väčšiemu odpudzovaniu molekúl.

Naopak nárast viskozity je sledovaný v roztoku s prídavkom aminokyseliny lysinu, ktorý po jeho disociácii v roztoku získava kladný náboj. Bázický charakter lysinu spôsobí disociáciu molekúl vody, ktoré sú vytiesnené z už existujúcej gélovej štruktúry. Dochádza tak k nahusteniu reťazcov agarózy, čím sledovaný systém zvyšuje svoju viskozitu

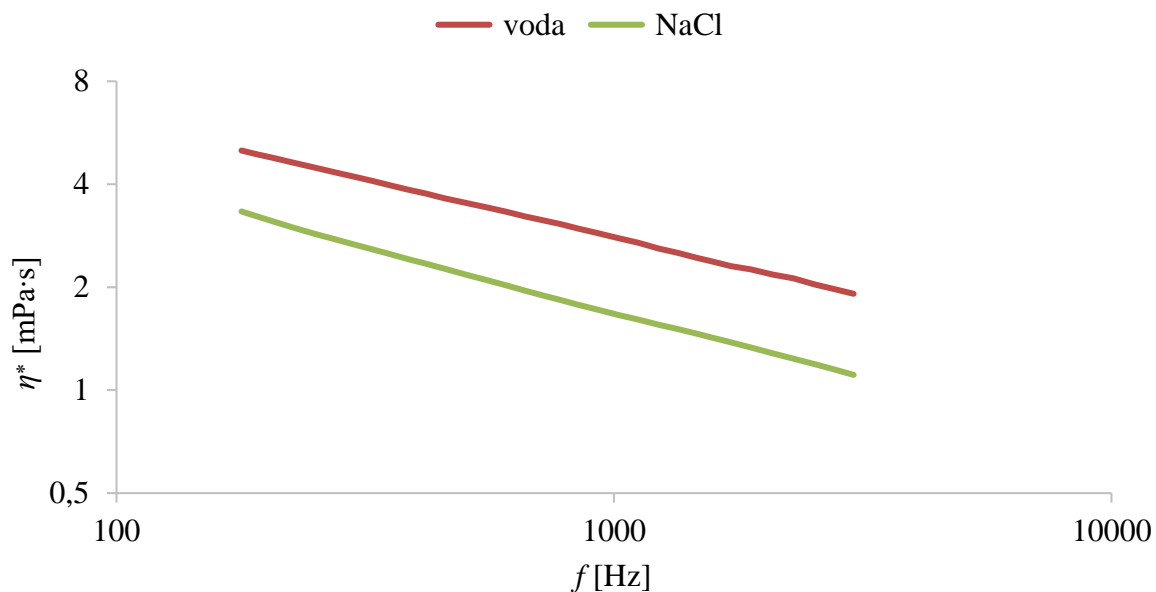
5.3.3 Vplyv iónovej sily

Keďže i zmena iónovej sily roztoku má vplyv na výsledné mikrореologické vlastnosti, bola práve iónová sila ďalším parametrom, skúmaným v tejto diplomovej práci. V tomto experimente bol teda sledovaný vplyv iónovej sily na viskoelastické vlastnosti agarózového hydrogélu s prídavkom polyelektrolytu PSS. V tomto prípade nebola ako rozpúšťadlo používaná voda ale roztoky chloridu sodného. Skúmané boli tri typy vzoriek:

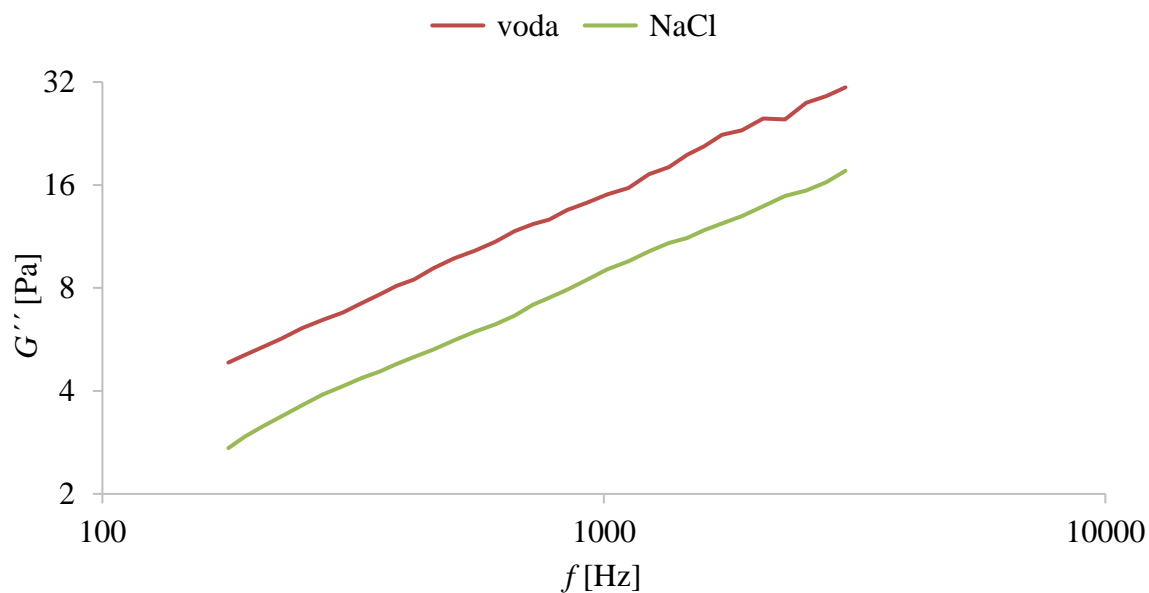
- prídavok 0,002 hm. % PSS v 0,01 M NaCl
- prídavok 0,005 hm. % PSS v 0,01 M NaCl
- prídavok 0,002 hm. % PSS v 0,15 M NaCl.

Pomocou mikrореologie dynamického rozptylu svetla sa však podarilo preskúmať len jednu zo spomínaných vzoriek, a to hydrogél s prídavkom 0,002 hm. % PSS v 0,01 M NaCl. Táto skutočnosť je zapríčinená tým, že v týchto roztokoch dochádza k nárastu medzičasticových interakcií. Vzájomné pôsobenie medzi iónmi je silnejšie a dosahuje do väčších vzdialeností v porovnaní s nenabitými molekulami. Tento jav sa prejaví už i pri prídavku veľmi malého množstva polyelektrolytu, v okolí ktorého sa začnú zoskupovať ióny s opačným znamienkom. Elektrostatické sily priťahujú opačne nabité ióny a vložené mikrореologické častice tak získajú vyššiu energiu, čo umocní ich spontánny pohyb. Pokiaľ je však nárast iónovej sily moc veľký dochádza k vyzrážaniu častíc, ktoré už nemajú schopnosť spontánneho pohybu.

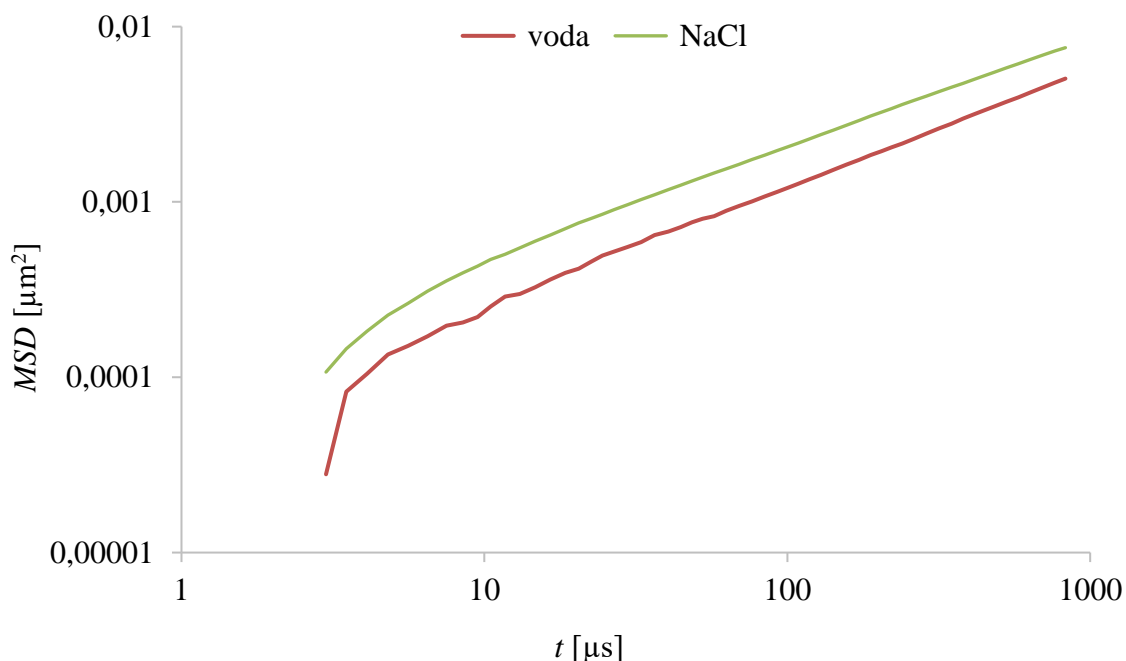
Na priložených grafoch (Obrázok 30, Obrázok 31, Obrázok 32) môžeme vidieť, že použitie soli má výrazný vplyv na výsledné mikrореologické vlastnosti hydrogéllov. V preskúmanom roztoku nastáva výrazný pokles viskózneho modulu a teda zníženie viskozity, pretože vložené mikrореologické častice vykazujú väčší pohyb v roztoku. Taktiež dochádza k nárastu nameraných hodnôt MSD pre častice, pohybujúce sa v agarózovom géle pripravenom v roztoku chloridu sodného.



Obrázok 30: Graf závislosti komplexnej viskozity na frekvencii pre 0,50 hm. % agarózový roztok s prídavkom 0,002 hm. % PSS pripravený vo vodnom prostredí a v roztoku chloridu sodného. Obe osy sú zobrazené v logaritmickom meradle.



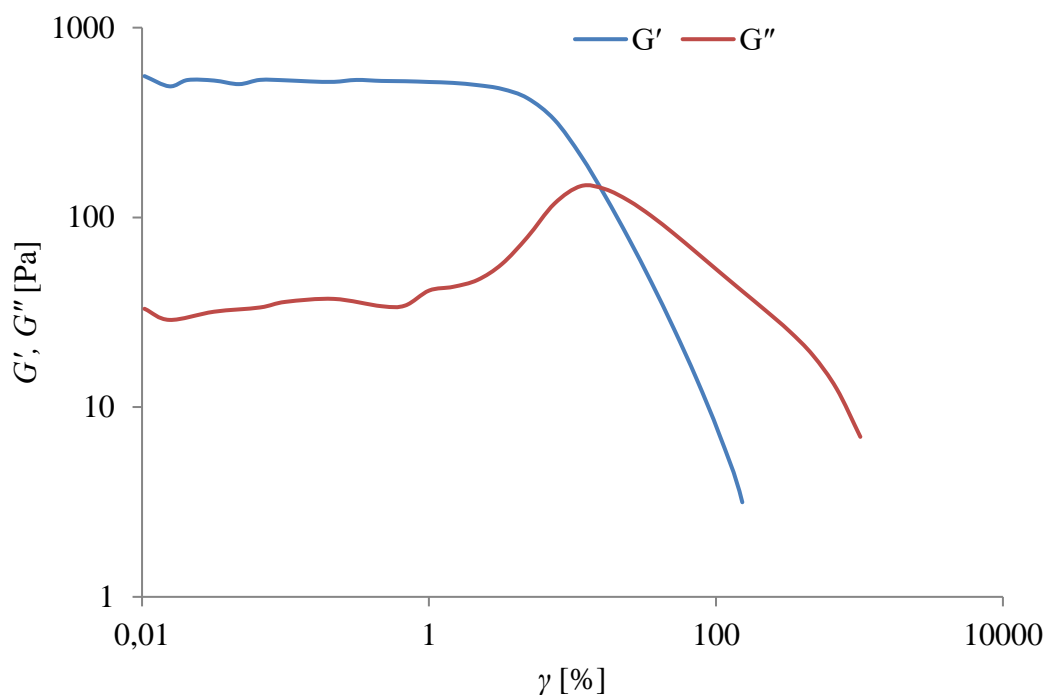
Obrázok 31: Graf závislosti viskózneho modulu na frekvencii pre 0,50 hm. % agarózový roztok s prídavkom 0,002 hm. % PSS pripravený vo vodnom prostredí a v roztoku chloridu sodného. Obe osy sú zobrazené v logaritmickom meradle.



Obrázok 32: Graf závislosti MSD na čase pre 0,50 hm. % agarózový roztok s prídavkom 0,002 hm. % PSS pripravený vo vodnom prostredí a v roztoku chloridu sodného.

5.4 Makroreologická charakterizácia hydrogélů

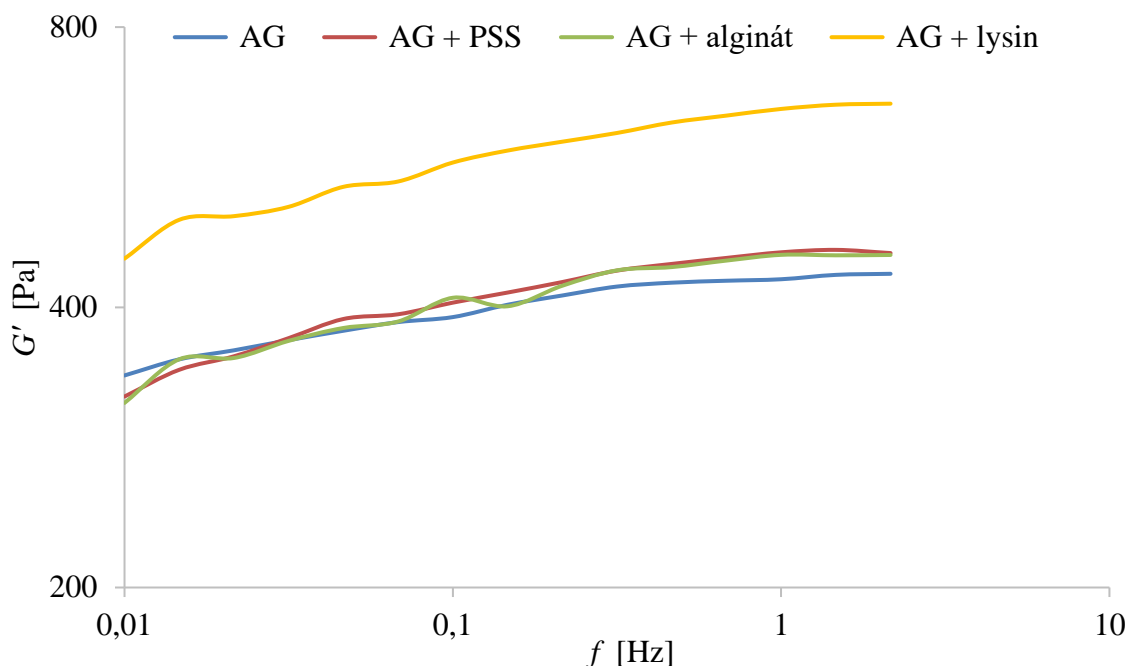
Aby sme mohli posúdiť výpovednú hodnotu nameraných dát z DLS mikroreológie, boli agarózové roztoky s prídavkom polyelektrolytu charakterizované i z makroskopického hľadiska. Preto bola zmeraná i klasická reológia týchto roztokov. Pripravené agarózové hydrogély boli študované pomocou dvoch oscilačných testov. Na základe amplitúdového degradačného testu boli sledované mechanické vlastnosti vzoriek v čase, čím sme získali informácie o ich stabilite. V grafe závislosti amplitúdy deformácie na viskóznom a elastickom module (Obrázok 33) môžeme vidieť, že rozsah viskoelastickej oblasti pre čistý 0,50 hm. % agarózový gél sa nachádza približne v rozmedzí hodnôt 0,01–2,00 %. A keďže rozsahy lineárnych viskoelastických oblastí pre agarózové systémy s prídavkom polyelektrolytov vychádzali veľmi podobne, bola hodnota amplitúdy deformácie, pre nasledujúce frekvenčné testy, zvolená na 0,5 %. Pri tejto amplitúde deformácie ešte nedochádza k nevratnej deformácii skúmaného materiálu.



Obrázok 33: Ukážka grafu závislosti amplitúdy deformácie na moduloch pre 0,50 hm. % agarózový gél bez prídavku polyelektrolytu získaný pri deformačnom teste.

Po zistení potrebnej amplitúdy deformácie sa mohlo pristúpiť k frekvenčným testom, na základe ktorých boli preskúvané reologické vlastnosti študovaných vzoriek s prídavkom rozličných polyelektrolytov. Tieto vlastnosti sú zobrazené v nasledujúcich grafoch.

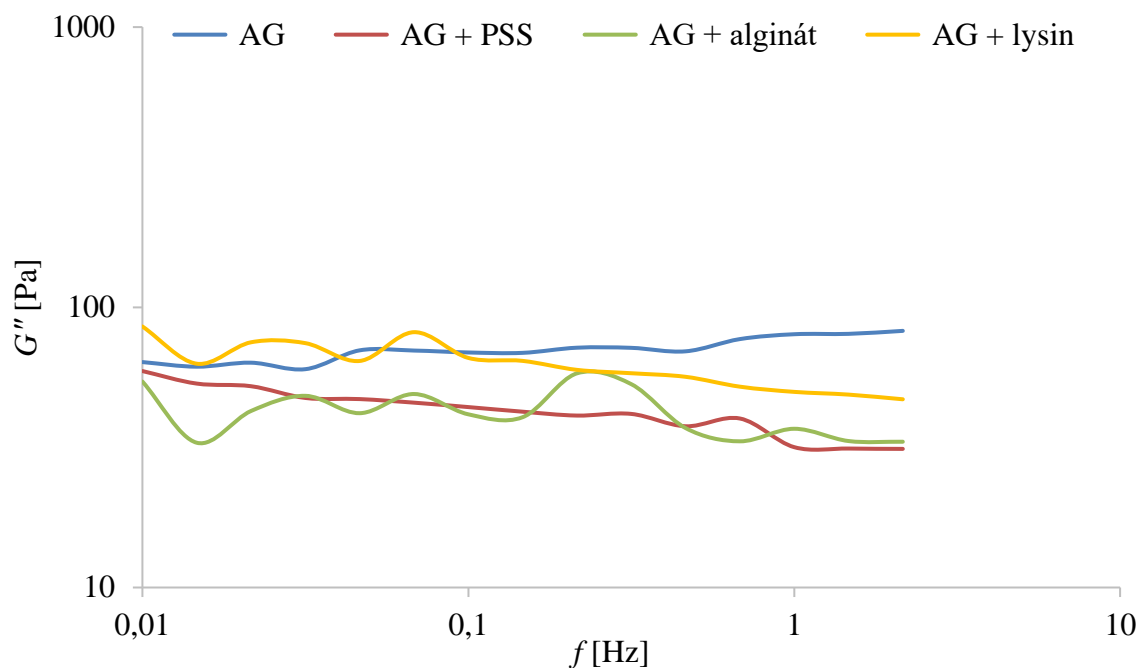
Na základe grafov závislosti elastického a viskózneho modulu na frekvencii otáčania (Obrázok 34) môžeme tvrdiť, že skúmané roztoky vykazujú typické chovanie pre gélové systémy, čo znamená, že namerané hodnoty elastického modulu výrazne prevyšujú hodnoty odpovedajúce modulu viskóznemu. Najväčší rozdiel medzi modulmi je vždy pozorovaný pri vyšších frekvenciách otáčania, čo znamená, že sledované hydrogély sú pri vyšších frekvenciách oscilácie odolnejšie voči ich deformáciám. Na grafe závislosti elastického modulu na frekvencii oscilácie (Obrázok 34) si môžeme všimnúť, že jeden zo sledovaných hydrogélů nadobúda vyšších hodnôt elastického modulu ako ostatné. Jedná sa o hydrogél s prídavkom lysinu. Tento gél tak vytvára najpevnejšiu štruktúru. Pri pohľade na agarózové systémy s obsahom aglinátu a PSS môžeme vidieť, že s rastúcou hodnotou frekvencie otáčania sa zvyšuje aj ich elastický modul. Hodnoty elastického modulu pre tieto hydrogély tak nadobúdajú vyšších hodnôt ako má hydrogél bez prídavku aktívnej látky.



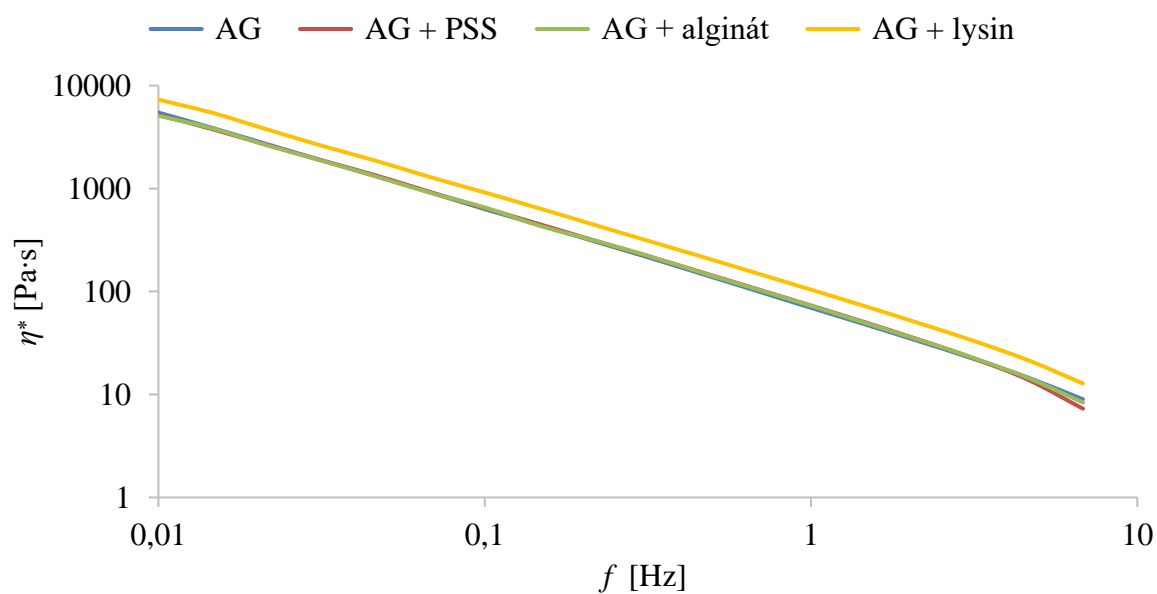
Obrázok 34: Graf závislosti elastickeho modulu na frekvencii pre 0,50 hm. % agarózový roztok s prídavkom 0,002 hm. % polyelektrolytu.

Z grafu závislosti viskózneho modulu na frekvencii otáčania (Obrázok 35) je zase zrejmé, že hodnoty viskózneho modulu pre agarózové hydrogély s prídavkom PSS a alginátu sa v porovnaní s čistým agarózovým gélom so zvyšujúcou sa frekvenciou otáčania znižujú. Ich stratová zložka však po celý čas merania nadobúda nižších hodnôt, a preto majú tieto roztoky v porovnaní s agarózovým gélom bez prídavku aktívnej látky nižšiu viskozitu. Ďalej si môžeme všimnúť, že viskózný modul pre systém s prídavkom lysinu opäť vykazuje pri vyšších frekvenciách oscilácie klesajúci charakter a od určitej hodnoty má tento hydrogél taktiež nižšie hodnoty nameraného viskózneho modulu ako mal agarózový gél bez prídavku polyelektrolytu.

Na grafe závislosti komplexnej viskozity na frekvencii otáčania (Obrázok 36) je vidieť, že najväčšiu zmenu vo svojom viskoelastickom chovaní vykazuje opäť hydrogél s prídavkom lysinu, ktorý dosahuje najvyšších hodnôt komplexnej viskozity. Tento hydrogél tak nadobúda najväčší príspevok elastickej zložky materiálu v porovnaní s ostatnými skúmanými hydrogélmi. Ďalej si môžeme všimnúť, že agarózové systémy obsahujúce vo svojej štruktúre záporne nabitý polyelektrolyt sa so svojimi nameranými hodnotami komplexnej viskozity líšia len nepatrne, a preto sa na základe tohto grafu nedá určiť ich vzájomná zmena viskoelastických vlastností. Z grafu je taktiež zrejmé, že hodnoty komplexnej viskozity pre všetky používané vzorky sa so zvyšujúcou sa frekvenciou otáčania lineárne znižujú.



Obrázok 35: Graf závislosti viskózneho modulu na frekvencii pre 0,50 hm. % agarózový roztok s prídavkom 0,002 hm. % polyelektrolytu.

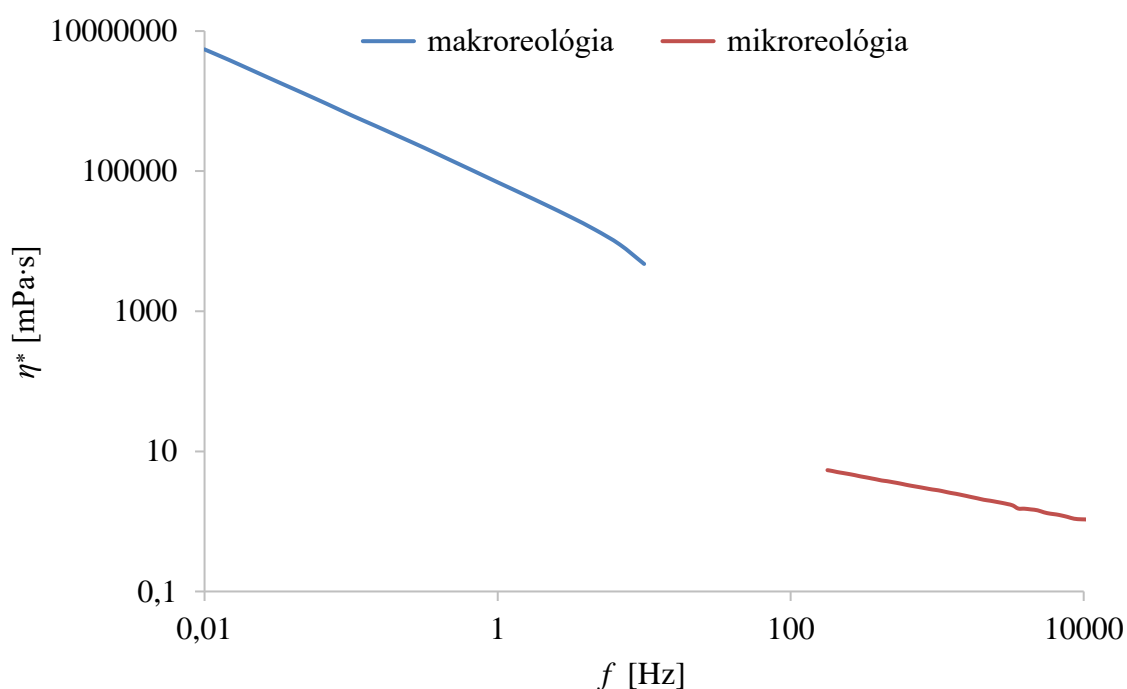


Obrázok 36: Graf závislosti komplexnej viskozity na frekvencii pre 0,50 hm. % agarózový roztok s prídavkom 0,002 hm.% polyelektrolytu.

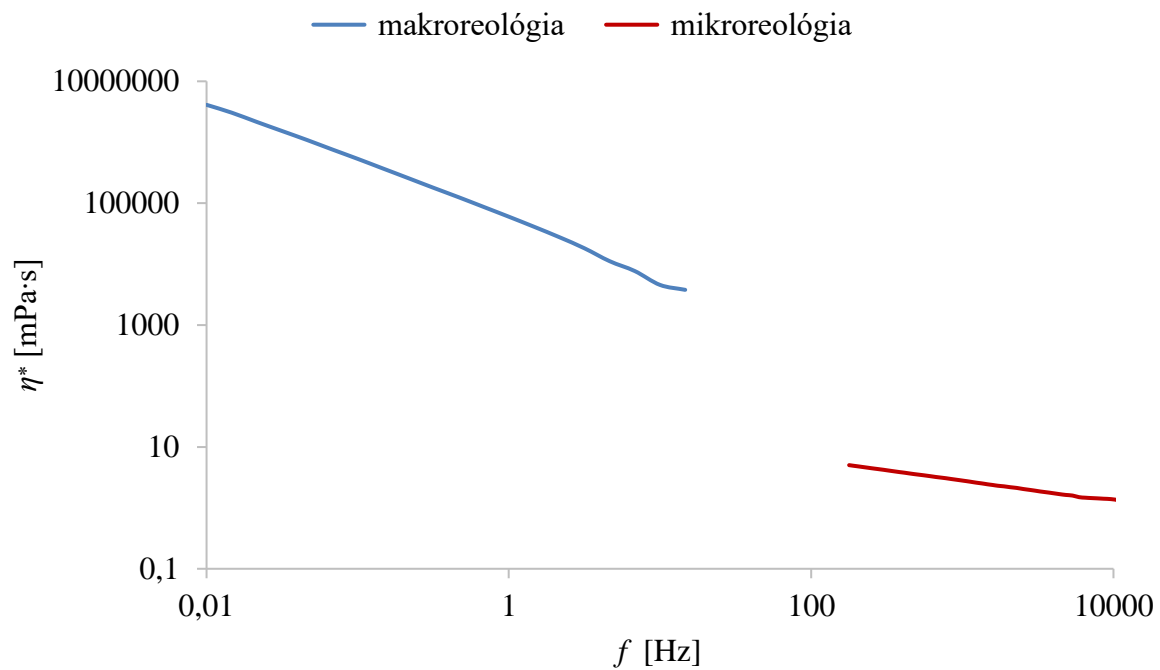
5.5 Korelácia dát

Posledný bod tejto diplomovej práce je zameraný na koreláciu dát, získaných použitím klasickej reológie a mikroreológie dynamického rozptylu svetla. Keďže každá z techník využíva k interpretácii výsledkov iné jednotky, museli byť najskôr všetky získané hodnoty zjednotené.

Využitím týchto techník boli získané závislosti komplexnej viskozity na frekvencii oscilácie, ktoré boli pre 0,50 hm. % agarózový gél bez prídavku aktívnej látky vynesené do spoločného grafu (Obrázok 37). Môžeme vidieť, že hodnoty frekvencie otáčania v prípade makroreologickej charakterizácie sa pohybujú v rozmedzí 0,01–100 Hz. Do vyšších hodnôt frekvencie oscilácie nás dostáva práve použitie mikroreológie, vďaka ktorej sme mohli preskúmať používané hydrogély vo frekvenciách blížiacich sa až k hodnote 10 000 Hz. Z grafu môžeme ešte vyčítať, že v oboch prípadoch, či už použitím reológie alebo mikroreológie dynamického rozptylu svetla, nastáva pokles komplexnej viskozity vzoriek so stúpajúcou hodnotou frekvencie otáčania. Na základe týchto výsledkov môžeme povedať, že tam, kde končí rozsah klasickej reológie sa začínajú uplatňovať možnosti pomerne novej techniky, zvanej mikroreológia.



Obrázok 37: Graf závislosti komplexnej viskozity na frekvencii otáčania pre 0,50 hm. % agarózový gél. V grafe sú zobrazené hodnoty získané použitím makroreológie a mikroreológie.



Obrázok 38: Graf závislosti komplexnej viskozity na frekvencii pre 0,05 hm. % agarózový roztok s prídavkom 0,002 hm. % PSS. V grafe sú zobrazené hodnoty získané použitím makroreológie a mikroreológie.

6 ZÁVER

Hlavným cieľom tejto diplomovej práce bolo využitie mikrореologických metód k štúdiu hydrogélových systémov na báze polyelektrolytov. Jednalo sa o techniky ako sú mikrореológia dynamického rozptylu svetla a mikrореológia fluorescenčnej korelačnej spektroskopie. Keďže je však metóda DLS mikrореológie málo preskúmanou technikou v oblasti mikrореológie, táto práca bola zameraná predovšetkým na využitie tejto techniky k štúdiu viskoelastických vlastností. Pre zrovnanie nameraných výsledkov bola použitá metóda klasickej reológie.

K splneniu tohto cieľa musela byť metóda dynamického rozptylu svetla najskôr optimalizovaná za pomoci vybraných agarózových systémov. Hlavným indikátorom správnej optimalizácie tejto metódy bolo získanie správnej korelačnej priamky. Tá bola dosiahnutá až po preskúmaní viacerých parametrov. Konkrétne sa jednalo o objem, veľkosť a druh použitých mikrореologických častíc, polohu merania a vhodnú hmotnostnú koncentráciu agarózového gélu, do ktorého boli neskôr pridávané rôzne polyelektrolyty. Pred samotným meraním mikrореológie však bolo ešte nutné overiť, či vo zvolenom agarózovom roztoku nedochádza k interakciám vložených mikrореologických častíc, či už medzi sebou, alebo s molekulami agarózy. Taktiež bolo treba vylúčiť možnosť zhlukovania molekúl.

Po optimalizácii DLS mikrореológie sa mohlo pristúpiť k štúdiu transportných procesov v agarózových systémoch. V prvom experimente bolo pozorované aký vplyv na viskoelastické vlastnosti má prídanie rôzneho objemu polyméru do agarózovej matrice. Sledované boli roztoky s prídavkom 0,002 hm. %; 0,005 hm. % a 0,010 hm. % polyelektrolytu. Na základe nameraných dát môžeme tvrdiť, že systémy s vyšším prídavkom aktívnej látky majú nižšie viskoelastické vlastnosti, čo znamená, že majú lepšie transportné vlastnosti.

V druhom experimente bol sledovaný vplyv rôzne nabitých aktívnej látky na mikrореologické vlastnosti sledovaných vzoriek. Z kladne nabitých polyelektrolytov bol zvolený *L*-lysin a chitozán. Zo záporne nabitých polyelektrolytov bol používaný PSS, alginát, dextrán a kyselina hyaluronová. Dva polyméry sa však z dôvodu ich veľkej priestorovej štruktúry nepodarilo zmerať. Jednalo sa o kyselinu hyaluronovú a dextrán. Chitozán zase zvyšoval pamäťovú zložku materiálu natoľko, že častice sa v roztoku nemohli pohybovať a práve preto systémy s prídavkom tohto polyméru nebolo možné preskúmať. Na základe nameraných mikrореologických dát sa ďalej zistilo, že prídavok kladne nabitého lysinu do agarózovej matrice taktiež spevňuje vnútornú štruktúru gélu, čo znamená, že došlo k zvýšeniu viskoelastických vlastností sledovaného materiálu. Prídavok záporne nabitých polyelektrolytov naopak znižuje viskózný charakter gélov. Preto sú agarózové systémy s prídavkom alginátu považované za najmenej viskózne.

V ďalšom experimente sme sa zamerali na sledovanie vplyvu iónovej sily na viskoelastické vlastnosti sledovaných systémov. Zistilo sa, že prídavok soli do roztoku hydrogél má výrazný vplyv na zmenu reologických vlastností gélov. To znamená, že došlo k poklesu komplexnej viskozity vzorky a roztok tak znížil svoju viskozitu. Aby však mohol byť sledovaný vplyv iónovej sily pomocou DLS mikrореológie, nesmie byť jej nárast v roztoku príliš veľký. Je to z toho dôvodu, že mikrореologické častice vtedy strácajú schopnosť spontánneho pohybu a tak tieto roztoky nie je možné zanalyzovať.

V druhej časti tejto diplomovej práce boli agarózové systémy s prídavkom polyelektrolytu charakterizované i pomocou klasickej reológie použitím dvoch oscilačných testov. Na základe amplitúdového degradačného testu boli zistené hodnoty amplitúdy deformácie, ktoré boli vzápätí použité v teste frekvenčnom. Získané tak boli grafy závislosti elastického a viskózneho modulu na frekvencii oscilácie a hodnoty komplexnej viskozity. Zistilo sa, že najväčší nárast elastickej zložky materiálu vykazuje gél obsahujúci prídavok lysinu. Naopak viskóznejšie sa javia roztoky s prídavkom alginátu a PSS.

Posledná časť tejto práce bola zameraná na koreláciu výsledkov získaných použitím makroreologickej a mikroreologickej techniky. Na základe týchto výsledkov môžeme povedať, že použitím oboch metód sme stanovili rovnakú zmenu vlastností agarózových hydrogélů s prídavkom polyelektrolytov. Použitie mikroreológie nás však posúva do vyšších hodnôt frekvencií oscilácie, teda za hranice klasickej reológie. To nám umožňuje teda merať i vo vyšších frekvenciách a tým komplexnejšie charakterizovať hydrogélóvé systémy.

V tejto diplomovej práci sa nám podarilo optimalizovať metódu DLS k štúdiu viskoelastických vlastností hydrogélóvých systémů a to z mikroreologického hľadiska.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. Rheology and Viscosity: Rheometers for measuring viscosity and viscoelasticity - from formulation to product use. Malvern[online]. Malvern [cit. 2016-10-29]. Dostupné z: <http://www.malvern.com/en/products/measurement-type/rheology-viscosity/>
2. JANALÍK, J.: Viskozita tekutin a její měření. 2010, VŠBTU, fakulta strojná Ostrava
3. STRUBLE, Leslie J.; JI, Xihuang. HANDBOOK OF ANALYTICAL TECHNIQUES IN CONCRETE SCIENCE AND TECHNOLOGY. New York, USA: William Andrew Publishing., 1999. Rheology, s. 333-367. ISBN 0-8155-1437-9.
4. Reologické chování tekutin – stanovení reogramů [online]. [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/RC.pdf>
5. KAPLANOVÁ, M: Polymerní materiály používané v polygrafii, 1. Základní vlastnosti polymerů, 2006. Dostupné z <http://slideplayer.cz/slide/2858176/>
6. Bekah, Devesh. Measurement of viscoelastic properties of treated and untreated cancer cells using passive microrheology: Dissertation. Toronto: Ryerson University, 2010, 53p.
7. Viskozita, [online], [cit. 22. 11. 2011], <http://cs.wikipedia.org/wiki/Viskozita>
8. BARNES, H. A., HUTTON a Kenneth WALTERS: An Introduction to Rheology. Elsevier, 1989
9. ELLERO, Marco. Passive Microrheology Simulations Using Stochastic Particle Methods. Procedia IUTAM. 2015, 18, 18-27. DOI: 10.1016/j.piutam.2015.11.003. ISSN 22109838. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210983815002722>
10. MIZUNO, D., D. A. HEAD, F. C. MACKINTOSH a C. F. SCHMIDT. Active and Passive Microrheology in Equilibrium and Nonequilibrium Systems. Macromolecules. 2008, 41(19), 7194-7202. DOI: 10.1021/ma801218z. ISSN 0024-9297. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma801218z>
11. BREUER, Kenneth S. Microscale diagnostic techniques. Berlin ; New York: Springer, 2005. ISBN 35-402-3099-8.
12. GARDEL, M. L., M. T. VALENTINE a D. A. WEITZ. Microrheology. Cambridge: Harvard University.
13. MOSCHAKIS, Thomas. Microrheology and particle tracking in food gels and emulsions. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2013, 18(4), 311–323. ISBN 10.1039/9781847557698-00303. Dostupné také z: <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781847557698-00303>
14. Microrheology Equations for Dynamic Light Scattering (DLS). AZO MATERIALS [online]. 2013 [cit. 2016-11-05]. Dostupné z: <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=9931>
15. W., BRADLEY, Stephen KEEN, Philipus J., Yacine HEMAR a Martin A.K. A Practical Review of Microrheological Techniques. 2013. DOI: 10.5772/53639. ISBN 10.5772/53639. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/rheology-new-concepts-applications-and-methods/a-practical-review-of-microrheological-techniques>

16. REGA, Carlos, John DUFFY, Fred MAZZEO a Samiul AMIN. Optimised Methodology for Dynamic Light Scattering (DLS) Microrheology. In: *Malvern Instruments Ltd* [online]. UK: Malvern, 2011 [cit. 2016-12-31]. Dostupné z: <http://www.eposters.net/pdfs/optimised-methodology-for-dynamic-light-scattering-dls-microrheology.pdf>
17. AMIN, S., S. BLAKE, S. M. KENYON, R. C. KENNEL a E. N. LEWIS. A novel combination of DLS-optical microrheology and low frequency Raman spectroscopy to reveal underlying biopolymer self-assembly and gelation mechanisms. *The Journal of Chemical Physics*. 2014, 141. DOI: 10.1063/1.4903785. ISBN 10.1063/1.4903785. Dostupné také z: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jcp/141/23/10.1063/1.4903785>
18. ORTEGA, Francisco, Hernán RITACCO a Ramón G. RUBIO. Interfacial microrheology: Particle tracking and related techniques. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2010, 15(4), 237–245.
19. GARDEL, M. L., M. T. VALENTINE a D. A. WEITZ. *Microrheology*. Cambridge: Harvard University.
20. In-depth analysis of viscoelastic properties thanks to Microrheology: non-contact rheology. *Formulation: Smart scientific analysis* [online]. 2010 [cit. 2016-12-31]. Dostupné z: <http://www.titanex.com.tw/doc/tecsupport/AN-RLAB-Viscoelastic-Properties.pdf>
21. CARRINGTON, Steve. Dynamic Light Scattering (DLS) Microrheology: Taking Rheological Characterization to Extremes. *American Laboratory* [online]. 2013 [cit. 2016-12-25]. Dostupné z: <http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/144247-Dynamic-Light-Scattering-DLS-Microrheology-Taking-Rheological-Characterization-to-Extremes/>
22. *FLUORESCENCE SPECTROSCOPY* [online]. [cit. 2016-12-31]. Dostupné z: http://www.oswego.edu/~kadima/CHE425/CHE425L/FLUORESCENCE_SPECTROSCOPY_08.pdf
23. FIŠAR, Z.: Principy fluorescenční spektroskopie [online]. 2009 [cit. 2016-12-25]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>
24. GORE, M. G.: Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach. Oxford: Oxford University Press, 2000. 368 p. ISBN 0-19-963812-8.
25. LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 978-0-387-31278-1.
26. FIŠAR, Z.: Principy fluorescenční spektroskopie [online]. 2009 [cit. 2015-04-14]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
27. ZEHENTBAUER, Florian M., Claudia MORETTO, Ryan STEPHEN, Thangavel THEVAR, John R. GILCHRIST, Dubravka POKRAJAC, Katherine L. RICHARD a Johannes KIEFER. Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: Concentration and solvent effects. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2014. DOI:

- 10.1016/j.saa.2013.10.062. ISBN 10.1016/j.saa.2013.10.062. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142513012195>
28. SHANKARLING, G. S. a K. J. JARAG. *Laser dyes. Resonance*. 2010. DOI: 10.1007/s12045-010-0090-9. ISBN 10.1007/s12045-010-0090-9. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12045-010-0090-9>
 29. VALEUR, B. a BERBERAN-SANTOS, M.: *Molecular fluorescence: principles and applications*. 2. vyd. Weinheim: Wiley, 2012, 569 p. ISBN 978-3-527-65003-3.
 30. SCHWILLE, Petra a Elke HAUSTEIN. *Fluorescence Correlation Spectroscopy - An Introduction to its Concepts and Applications*. 2001.
 31. RATHGEBER, Silke, Hans-Josef BEAUVISAGE, Hubert CHEVREAU, Norbert WILLENBACHER a Claude OELSCHLAEGER. *Microrheology with Fluorescence Correlation Spectroscopy. American Chemical Society*. 2009, **25**(11), 6368-6376. DOI: 10.1021/la804170k. ISBN 10.1021/la804170k. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la804170k>
 32. RIES, Jonas a Petra SCHWILLE. *Fluorescence correlation spectroscopy. BioEssays*. 2012, , 361-368. DOI: 10.1002/bies.201100111. ISBN 10.1002/bies.201100111. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bies.201100111>
 33. Research: Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS). *Biophysics of Macromolecules* [online]. Germany [cit. 2016-12-27]. Dostupné z: <https://www.dkfz.de/Macromol/research/fcs.html>
 34. Jensen, E. C., Yan, Y., Marriot, G., Bright, R. Right, G.W., Fisher, W. J. R. : Types of Imaging, Part 2: An Overview of Fluorescence Microscopy. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 2012, 295(10), 271-306.
 35. JENSEN, Ellen C., Yuling YAN, Gerard MARRIOTT, G.R. BRIGHT, G.W. FISHER, J. ROGOWSKA, D.L. TAYLOR, David A. AGARD, Yasushi HIRAOKA, Peter SHAW, John W. SEDAT, G.J. BRAKENHOFF, E.A. Van SPRONSEN, H.T.M. Van Der VOORT, N. NANNINGA, Donna J. ARNDT-JOVIN, Thomas M. JOVIN, Daniel AXELROD, Daniel AXELROD, Shinya INOUÉ, Daniel AXELROD, Edward H. HELLEN a David E. WOLF. Types of Imaging, Part 2: An Overview of Fluorescence Microscopy. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 2012, 295(10), 271-306. DOI: 10.1016/s0091679x(08)60983-8
 36. POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 3. Praha: VŠCHT Praha, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
 37. KLADEKOVÁ, DANIELA. *VYBRANÉ KAPITOLY Z KOLOIDNEJ CHÉMIE: Vysokoškolské učebné texty*. Košice: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, 2011. ISBN 978-80-7097-885-6.
 38. BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠÍŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 1. Praha: VŠCHT Praha, 2005. ISBN 80-7080-579-X.

39. <http://vydavatelstvi.vscht.cz>. Vydavatelství VŠCHT [online]. [cit. 2016-12-29]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es001/hesla/synereze.htmlhttp://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/gelace.html
40. BARTOVSKÁ, Lidmila; ŠIŠKOVÁ, Marie. Vydavatelství VŠCHT Praha [online]. 2005 [cit. 2016-12-29]. Co je co v povrchové a koloidní chemii : výkladový slovník. Dostupné z www: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/
41. RENN, Donald W. Agar and agarose: indispensable partners in biotechnology. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*. 1984, 23(1), 17-21. DOI: 10.1021/i300013a004. ISBN 10.1021/i300013a004. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/i300013a004>
42. FUJII, T. Scaling analysis on elasticity of agarose gel near the sol–gel transition temperature. *Food Hydrocolloids*. 2000, 14(4), 359-363. DOI: 10.1016/S0268-005X(00)00012-6. ISBN 10.1016/S0268-005X(00)00012-6. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X00000126>
43. RINAUDO, Marguerite. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*. 2008, 57(3), 397-430. DOI: 10.1002/pi.2378. ISBN 10.1002/pi.2378. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pi.2378>
44. STOKOLS, Shula, Jeff SAKAMOTO, Chris BRECKON, Todd HOLT, James WEISS a Mark H. TUSZYNSKI. Templated Agarose Scaffolds Support Linear Axonal Regeneration. *Tissue Engineering*. 2006, 12(10), 2777-87. DOI: 10.1089/ten.2006.12.2777. ISBN 10.1089/ten.2006.12.2777. Dostupné také z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.2006.12.2777>
45. Chemicals. *The International Genetically Engineered Machine Competition* [online]. USA [cit. 2016-12-30]. Dostupné z: <http://2016.igem.org/Team:Oxford/Chemicals>
46. <http://vydavatelstvi.vscht.cz>. Vydavatelství VŠCHT [online]. [cit. 2016-12-29]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/polyelektrolyt.htmlhttp://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/gelace.html
47. NOVÁK, Josef a kol. *Fyzikální chemie - bakalářský a magisterský kurz*. 1. Praha: VŠCHT Praha, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3.
48. DOBRYNIN, A a M RUBINSTEIN. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Progress in Polymer Science*. 2005, 30(11), 1049–1118. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2005.07.006. ISBN 10.1016/j.progpolymsci.2005.07.006. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670005000936>
49. DAUTZENBERG, H., W. JAEGER, J. KÖTZ, B. PHILIPP, Ch. SEIDEL a D. STSCHERBINA. *Polyelectrolytes: Formation, Characterization and Application*. Hanser/Gardner Publications, 1994. ISBN 3-446-17127-3.
50. CHEN, W. Y. JOHN a GIOVANNI ABATANGELO. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound repair and regeneration*. 1999, 7(2), 79–89. DOI: 10.1046/j.1524-

- 475X.1999.00079.x. ISBN 10.1046/j.1524-475X.1999.00079.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1524-475X.1999.00079.x>
51. PAPAKONSTANTINO, Eleni, Michael ROTH a George KARAKIULAKIS. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato Endocrinology*. 2012, 4(3), 253–258. DOI: 10.4161/derm.21923. ISBN 10.4161/derm.21923. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/derm.21923>
 52. FRASER, J. R. E., T. C. LAURENT a U. B. G. LAURENT. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of internal medicine*. 1997, 242(1), 27-33. DOI: 10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x. ISBN 10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x>
 53. <http://www.madsci.org/posts/archives/apr2001/986571103.Bc.r.html>
 54. KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2007, 29(1), 17-25. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. ISBN 10.1007/s10529-006-9219-z. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>
 55. RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006, 31(7), 603-632. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001. ISBN 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670006000530>
 56. KHOR, Eugene. Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002, 6(4), 313-317. DOI: 10.1016/S1359-0286(02)00002-5. ISBN 10.1016/S1359-0286(02)00002-5. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359028602000025>
 57. BAYSAL, Kemal, Ayse Z. AROGUZ, Zelal ADIGUZEL a Bahattin M. BAYSAL. Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: Preparation, characterization and application for cell growth purposes. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013, 59, 342–348. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.073. ISBN 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.073. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813013002560>
 58. VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. Chitosan and Its Pharmaceutical Applications. Chemicke listy. Praha: Česká společnost chemická, 2009. ISSN 0009-2770.
 59. LEE, K.Y, D.J.MOONEY. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012; 37(1):106-126. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
 60. Compendium of food additive specifications: Sodium alginate. *FAO Corporate Document Repository* [online]. 1997 [cit. 2016-12-31]. Dostupné z: <http://www.fao.org/docrep/W6355E/w6355e0x.htm>
 61. Microcapsule degradation. *IGEM* [online]. 2012 [cit. 2016-12-31]. Dostupné z: <http://2012.igem.org/Team:Slovenia/SafetyMechanismsMicrocapsuleDegradation>
 62. VANĚREK, Jan a a spol. *Kovové a dřevěné materiály*. Brno, 2006.
 63. http://www.dow.com/assets/attachments/industry/building_construction/Cellosize_brochure.pdf

64. MOSCHAKIS, Thomas, Brent S. MURRAY a Eric DICKINSON. On the kinetics of acid sodium caseinate gelation using particle tracking to probe the microrheology. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010, 345(2), 278-285. DOI: 10.1016/j.jcis.2010.02.005. ISSN 00219797. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979710001633>
65. MOSCHAKIS, Thomas, Athina LAZARIDOU a Costas G. BILIADERIS. Using particle tracking to probe the local dynamics of barley β -glucan solutions. *Procedia Food Science*. 2011, 1, 294-301. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.046. ISSN 2211601x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11000472>
66. NIXON, Ryan, Alison DUNN, Juan URUENA, W.G. SAWYER a Thomas ANGELINI. Hydrogel surface viscoelasticity and mesh- size characterised with microrheology. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2013, 36, e28-. DOI: 10.1016/j.clae.2013.08.099. ISSN 13670484. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367048413002130>
67. CORRIGAN, A. M. a A. M. DONALD. Particle tracking microrheology of gel-forming amyloid fibril networks. *The European Physical Journal E*. 2009, 28(4), 457-462. DOI: 10.1140/epje/i2008-10439-7. ISSN 1292-8941. Dostupné také z: <http://www.springerlink.com/index/10.1140/epje/i2008-10439-7>
68. LARSEN, Travis, Kelly SCHULTZ a Eric M. FURST. Hydrogel microrheology near the liquid-solid transition. *Korea-Australia Rheology Journal*. 2008, 20(3), 165-173.
69. WEHRMAN, Matthew D., Seth LINDBERG a Kelly M. SCHULTZ. Quantifying the dynamic transition of hydrogenated castor oil gels measured via multiple particle tracking microrheology. *Soft Matter*. 2016, 12(30), 6463-72. DOI: 10.1039/c6sm00978f. ISBN 10.1039/C6SM00978F. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6SM00978F>
70. LIANG, W., J. R. GUMAN-SEPULVEDA, S. HE, A. DOGARIU a J. Y. FANG. Microrheology and Release Behaviors of Self-Assembled Steroid Hydrogels. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*. 2015, 03(08), 6-15. DOI: 10.4236/msce.2015.38002. ISSN 2327-6045. Dostupné také z: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/msce.2015.38002>
71. DE BRUYN, JR a FK OPPONG. Microrheology and dynamics of an associative polymer. *Eur Phys J E Soft Matter*. 2010, 31(1), 25-35
72. AMIN, S., S. BLAKE, S. M. KENYON, R. C. KENNEL a E. N. LEWIS. A novel combination of DLS-optical microrheology and low frequency Raman spectroscopy to reveal underlying biopolymer self-assembly and gelation mechanisms. *The Journal of Chemical Physics*. 2014, 141(23), 234201-. DOI: 10.1063/1.4903785. ISSN 0021-9606. Dostupné také z: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jcp/141/23/10.1063/1.4903785>
73. DE BRUYN, John R. Modeling the microrheology of inhomogeneous media. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*. 2013, 193, 21-27. DOI: 10.1016/j.jnnfm.2012.05.002. ISSN 03770257. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377025712000936>

74. SCHUSTER, Erich, Kristin SOTT, Anna STRÖM, Annika ALTSKÄR, Nick SMISDOM, Tobias GEBÄCK, Niklas LORÉN a Anne-Marie HERMANSSON. Interplay between flow and diffusion in capillary alginate hydrogels. DOI: 10.1039/C6SM00294C. ISBN 10.1039/C6SM00294C. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6SM00294C>
75. RATHGEBER, Silke, Hans-Josef BEAUVISAGE, Hubert CHEVREAU, Norbert WILLENBACHER a Claude OELSCHLAEGER. Microrheology with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Langmuir*. 2009, 25(11), 6368–6376. DOI: 10.1021/la804170k. ISBN 10.1021/la804170k. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la804170k>
76. Dextran Properties. *Pharmacosmos: Dextran* [online]. 2011 [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <http://www.dextran.net/about-dextran/dextran-chemistry/dextran-properties.aspx>
77. PEŠKOVÁ, K., Lysin [online].[cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/KPAAQ.htm>
78. AMIEL, C., GALANT, C., AUVRAY, L.: Ternary complexes involving a β -cyclodextrin polymer, a cationic surfactant and anionic polymer. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 2004, č. 126, s. 44–46.
79. Polystyrene sulfonate.png. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2015 [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polystyrene_sulfonate.png

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

8.1 Použité skratky

VBPTM	Videomikroreológia
PTM	jednočasticová mikroreológia
TPM	dvojčasticová mikroreológia
DLS	dynamický rozptyl svetla
DWS	difúzna vlnová spektrometria
FCS	fluorescenčná korelačná spektroskopia
QELS	elastický rozptyl svetla
PCS	fotónová korelačná spektroskopia
MPT	viacnásobné sledovanie častíc
MSD	stredný kvadratický posun
GSER	zovšeobecnená Stokes – Einsteinová rovnica
HyA	kyselina hyaluronová
DMSO	dimethylsulfoxid
HCO	hydrogenovaný ricínový olej
NaDC	deoxycholát sodný
DOX	doxorubicin hydrochlorid
hmHEC	hydroxyetylcelulóza
PSS	poly(sódium 4-styrénsulfonát)
LVO	viskoelastická oblasť
PPD	points per decade
AG	agarózový gél
PSČ	polystyrénové častice
FČ	fluorescenčné častice

8.2 Použité symboly

D	difúzny koeficient
d	d -rozmer častíc
τ	časový interval
A	časový exponent
k_B	Boltzmanová konštanta
T	teplota
F	fričkný koeficient
a	polomer častice
η	koeficient viskozity
g_l	autokorelačná funkcia
q	veľkosť rozptylu
n	index lomu rozpúšťadla
λ	vlnová dĺžka svetla
θ	uhol rozptylu
ω	uhlová frekvencia
Γ	gama funkcia
G^*	komplexný modul
G'	elastický modul
G''	viskózný modul
I	intezita fluorescencie
N	počet molekúl
V	detekčný objem
c	koncentrácia fluorescenčných častíc
S	pomer strán detekčného objemu
w_0	veľkosť detekčného objemu